

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH SUBSTRÁTŮ A STANOVENÍ TRANSGLYKOZYLAČNÍCH AKTIVIT V ROSTLINÁCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

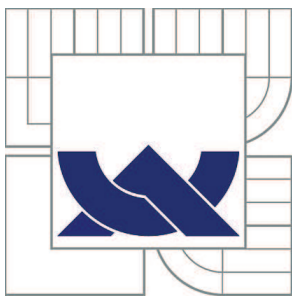
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

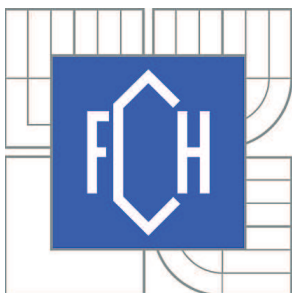
AUTHOR

KAMILA VELÍNSKÁ

BRNO 2014



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

PŘÍPRAVA FLUORESCENČNĚ ZNAČENÝCH SUBSTRÁTŮ A STANOVENÍ TRANSGLYKOZYLAČNÍCH AKTIVIT V ROSTLINÁCH

PREPARATION OF FLUORESCENTLY LABELED SUBSTRATES AND DETERMINATION OF
TRANSGLYCOSYLATION ACTIVITY IN PLANTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

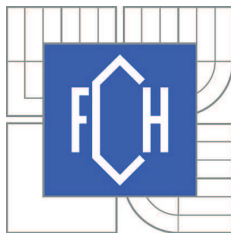
AUTOR PRÁCE
AUTHOR

KAMILA VELÍNSKÁ

VEDOUcí PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Zuzana Firáková

BRNO 2014



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0838/2013	Akademický rok: 2013/2014
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Kamila Velínská	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (B2901)	
Studijní obor:	Biotechnologie (2810R001)	
Vedoucí práce	Ing. Zuzana Firáková	
Konzultanti:	doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.	

Název bakalářské práce:

Příprava fluorescenčně značených substrátů a stanovení transglykozylačních aktivit v rostlinách

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární přehled k dané problematice
2. Popište použité metody hodnocení
3. Zpracujte naměřené výsledky z experimentů
4. Zhodnoťte získané výsledky formou diskuse

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Kamila Velínská
Student(ka)

Ing. Zuzana Firáková
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

Tato práce vznikla za podpory projektu BiochemNet - Vytvoření sítě pro podporu spolupráce biomedicínských pracovišť a zvýšení uplatnitelnosti absolventů biochemických oborů v praxi (registrační číslo CZ.1.07/2.4.00/31.0133). Projekt je realizován v rámci Operačního programu vzdělávání pro konkurenceschopnost, který je spolufinancovaný z Evropského sociálního fondu a státního rozpočtu ČR.



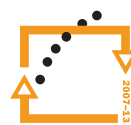
evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce byla zaměřena na přípravu fluorescenčně značených oligosacharidů a na stanovení transglykozylačních/heterotransglykozylačních aktivit enzymů ze semen dvouděložných rostlin. Jako modelové organismy se využily Lichořeřišnice větší a petržel Olomoucká dlouhá. Kvalita a složení značených akceptorových substrátů se monitorovala pomocí TLC a MALDI-TOF MS. Přítomnost enzymů v semenech rostlin se analyzovala pomocí SDS elektroforézy a IEF-PAGE. Transglykozylační aktivity se detekovaly s využitím papírové metody a HPLC. Výsledky naznačují, že v semenech studovaných rostlin se nachází enzymy, které katalyzují heterotransglykozylační reakce.

ABSTRACT

The bachelor's thesis was focused on preparation of fluorescently labeled oligosaccharides and detection of transglycosylating/heterotransglycosylating activities of enzymes from dicotyledons. As the model organisms nasturtium and parsley were used. The quality and composition of labeled acceptor substrates was monitored by TLC and MALDI-TOF MS. The presence of enzymes in the plant seeds was analysed by SDS electrophoresis and IEF-PAGE. The paper method and HPLC were used for the detection of transglycosylating activities. The obtained results suggest that enzymes catalyzing heterotransglycosylating reactions are in the seeds of studied plants.

KLÍČOVÁ SLOVA

rostlinná buněčná stěna, xyloglukan, xyloglukan endotransglykozyláza, heterotransglykozylace, fluorescenční metody

KEYWORDS

plant cell wall, xyloglucan, xyloglucan endotransglycosylase, heterotransglycosylation, fluorimetric methods

VELÍNSKÁ, K. *Příprava fluorescenčně značených substrátů a stanovení transglykozylačních aktivit v rostlinách*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 65 s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Zuzana Firáková.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé bakalářské práce Ing. Zuzaně Firákové, za vedení, pomoc a také za velmi cenné připomínky, rady, ochotu, vstřícnost a za čas, který mi věnovala při zpracování mé bakalářské práce. Velký dík patří také doc. Jiřině Omelkové, CSc a Ing. Evě Stratilové, Ph.D., za pomoc, ochotu a za umožnění vypracování bakalářské práce. V neposlední řadě děkuji i celému kolektivu ze Slovenské akademie věd za příjemné prostředí a spolupráci při vzniku této práce.

OBSAH

ABSTRAKT	4
1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Buněčná stěna	9
2.1.1 Funkce buněčné stěny	9
2.1.2 Složení buněčné stěny	9
2.2 Polysacharidy buněčné stěny	10
2.2.1 Celulóza	10
2.2.2 Pektin	10
2.2.3 Hemicelulózy	11
2.3 Xyloglukan	11
2.3.1 Struktura xyloglukanu	11
2.3.2 Nomenklatura xyloglukanu	12
2.4 Celulózo–xyloglukanová síť	12
2.5 Modifikace buněčné stěny	13
2.6 Xyloglukan endotransglykozyláza	14
2.6.1 Mechanismus transglykozylační reakce katalyzované xyloglukan endotransglykozyládou	15
2.6.2 Funkce xyloglukan endotransglykozylázy	16
2.6.3 Biochemická charakterizace XET	17
2.6.4 Metody na detekci a stanovení XET a XEH aktivit	17
2.6.5 Heterotransglykozylační reakce	19
2.7 Metody	20
2.7.1 Dialýza	20
2.7.2 Lyofilizace	20
2.7.3 Elektromigrační metody	21
2.7.3.1 Elektroforéza	21
2.7.3.2 Izoelektrická fokusace (IEF)	22
2.7.4 Chromatografické metody	23
2.7.4.1 HPLC	24
2.7.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)	25
2.7.5 Hmotnostní spektrometrie	26

2.7.6	Papírová metoda	27
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1	Přístroje a zařízení	28
3.2	Pomůcky	28
3.3	Chemikálie	28
3.4	Příprava fluorescenčně značených substrátů	29
3.4.1	Kontrola pomocí TLC	31
3.4.2	Kontrola čistoty fluorescenčně značených substrátů pomocí MS	31
3.5	Izolace proteinového extraktu ze semen lichořeřišnice a petržele	31
3.6	Elektroforéza	32
3.7	Izoelektrická fokusace	34
3.8	Detekce transglykozylačních aktivit	34
3.8.1	Měření aktivity pomocí papírové metody	34
3.8.2	HPLC	35
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	36
4.1	Identifikace značených oligosacharidů pomocí TLC	36
4.2	Identifikace značených oligosacharidů pomocí MALDI-TOF MS	36
4.3	Izolace proteinového extraktu ze semen lichořeřišnice a petržele	38
4.4	Elektroforéza	38
4.5	IEF	39
4.6	Detekce transglykozylačních aktivit lichořeřišnice a petržele	40
4.6.1	Papírová metoda	40
4.6.2	HPLC	47
5	ZÁVĚR	50
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	51
7	SEZNAM ZKRATEK	64

1 ÚVOD

Buněčná stěna rostlin je jednou z charakteristických znaků odlišujících rostlinnou buňku od živočišné. Vytváří ochranný obal buňky a je důležitá při regulaci tvaru rostlinných buněk v průběhu jejich růstu a při komunikaci rostlin s okolním prostředím. Buněčná stěna bývá složena především z polymerů celulózy, pektinu, hemicelulózy a z různých proteinů.

Xyloglukan je obsažen v primární buněčné stěně rostlin a řadí se mezi hemicelulózy. Vytváří s celulóзовými mikrofibrily nekovalentní komplexy. Vzniká tak třídimenzionální struktura, celulózo-xyloglukanová síť. Dnešní studie poukazují na to, že síť tvořena xyloglukanem a celulózou, je cílem enzymatických aktivit během růstu rostlin. A tedy ovlivňuje pevnost buněčné stěny.

Jak je již zcela známo, buněčná stěna je metabolicky aktivní, dochází nejen k biosyntéze, degradaci, ale i k jejím vratným a nevratným modifikacím. Strukturální změny buněčné stěny jsou výsledkem činnosti různých enzymů, například glykanáz, glykozidáz a transglykozyáz.

V průběhu několika posledních let byly identifikovány čtyři enzymy, které přispívají k restrukturalizaci buněčné stěny a katalyzují endohydrolýzu nebo endotransglykozylaci sacharidových komponentů. Mezi tyto enzymy patří i xyloglukan endotransglykozyláza (XET). Enzym XET má významnou roli v metabolismu xyloglukanu, díky tomu se podílí například na selektivní modifikaci buněčných stěn rostlin, na rozvolňování buněčných stěn v průběhu růstu, prodlužování buňky a zpevňování buněčných stěn.

Štěpení molekul xyloglukanu v buněčné stěně rostlin je katalyzováno xyloglukan endotransglykozyázou pomocí transglykozylačního mechanismu. Průběh této reakce odpovídá ping-pongovému reakčnímu mechanismu.

XET se nachází v mnohých rostlinách jako je rýže, houseníček, ječmen, topol, čočka, mungo fazole, lichořeřišnice, tamaryšek, petržel, květák, kiwi a další.

Studium enzymů, mezi které se řadí i XET je nesmírně důležité, nejen pro pochopení podstaty procesů probíhajících v buněčných stěnách, které se týkají spojování různých sacharidů, ale také ke všeobecnému pochopení procesů probíhajících v buněčné stěně rostlin. Především z tohoto důvodu byla tato práce zaměřená na detekci tansglykozylačních aktivit v semenech lichořeřišnice a petržele.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Buněčná stěna

2.1.1 Funkce buněčné stěny

Buněčná stěna je vysoce organizovaná struktura, která se aktivně účastní procesů probíhajících jak uvnitř buněčné stěny tak i procesů probíhajících na jejím povrchu [1].

Buněčné stěny jsou velice důležité při absorpci, přenosu a sekreci látek v rostlinách. Také jsou nezbytné při vnímání signálů (např.: tlakových) v interakci s patogeny a symbionty a hrají důležitou úlohu ve vnitrobuněčné komunikaci. Mají ústřední roli v morfogenezi včetně regulace a realizace buněčného dělení a polarity růstu [2]. Podmínkou růstu a organogeneze rostlin je schopnost růstu buněčné stěny, při které se uplatňuje vývojová a pletivová variabilita ve složení [3].

2.1.2 Složení buněčné stěny

Rostlinná buněčná stěna obvykle bývá představována jako struktura složená z rozsáhlých třídimenzionálních (3D) polysacharidických komplexů, oddělující buněčný obsah (spolu s polopropustnou cytoplasmatickou membránou) od vnějšího prostředí. Kromě sacharidů obsahuje různé bílkoviny a aromatické látky. Struktura buněčné stěny je dobře přizpůsobena k tomu, aby plnila zásadní biologické funkce jako je transport metabolitů v obou směrech (ven nebo dovnitř buňky), mechanická ochrana popřípadě růstová regulace během buněčného cyklu [1, 4].

Rostlinné buněčné stěny se liší především tloušťkou v závislosti na úloze buněk v celistvé rostlině. Pozorování ukázala, že ve všech rostlinných buňkách jsou dvě vrstvy: střední lamela a primární stěna. Navíc některé buňky vytváří ještě další vrstvu, sekundární stěnu. Střední lamela se nachází mezi primárními stěnami přilehlých buněk a je především složena z pektinových látek [2]. Buněčné stěny syntetizované během růstu buňky nebo ve fázi prodlužování se nazývají primární buněčné stěny. Během růstu a rozpínání existující buněčné stěny se snižuje její tloušťka a to může mít za následek mechanické oslabení. Růst nového materiálu tedy musí být pečlivě koordinovaný s vnitřním tlakem pletiv, což udržuje integritu buněčné stěny.

Složení primární buněčné stěny vyšších rostlin je různé. Hlavními složkami jsou polysacharidy a proteiny, kdy mnohé z nich jsou glykozylovány. Většina rostlinných buněk ukončí růst a ukládání materiálů do primární buněčné stěny, když dosáhne svojí konečné velikosti, přičemž si zachová svoji dynamickou strukturu. Po ukončení růstové fáze vzniká sekundární buněčná stěna, která se nachází mezi primární buněčnou stěnou a plasmatickou membránou. Sekundární buněčné stěny mají zejména mechanickou funkci. Například u dřevnatých rostlin je potřebná silná sekundární buněčná stěna, aby nedocházelo ke zhroucení buněk pod nátlakem okolních tkání [5].

Složení rostlinných buněčných stěn se významně liší podle buněčného typu. Například buněčná stěna dvouděložných rostlin obsahuje 30 % celulózy, 30 % hemicelulózy, 35 % pektinu a 1–5 % strukturálních proteinů. Naproti tomu některé jednoděložné rostliny obsahují 25 % celulózy, 55 % hemicelulózy a 10 % pektinu [6].

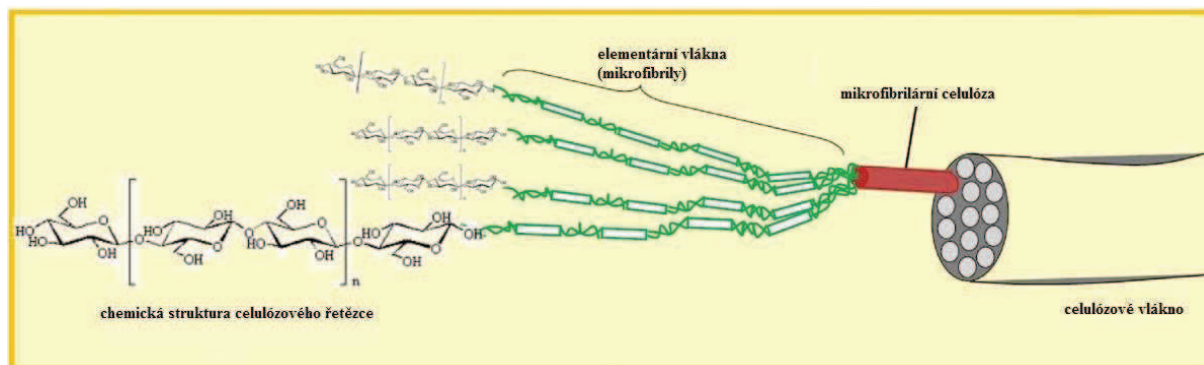
2.2 Polysacharidy buněčné stěny

2.2.1 Celulóza

Celulóza ($C_6H_{10}O_5$)_n je považována za nejhojnější organickou látku. Celosvětová produkce tohoto biopolymeru se odhaduje na 10^{10} až 10^{11} t ročně. Z tohoto množství je asi $6 \cdot 10^9$ t zpracováno v textilním, papírnickém nebo chemickém průmyslu. Celulóza je nejen hlavním stavebním materiálem dřeva, ale je také hlavní součástí rostlin (bavlna, konopí, len, atd.), rostlinných vláken, mořských živočichů (pláštěnce), nebo řas, hub, bezobratlých a bakterií. Od objevu celulózy A. Payenem v roce 1838 jsou její fyzikální a chemické aspekty intenzivně studovány. Dnes je už hierarchická struktura celulózy zcela objasněna [7].

Vlákna celulózy vykazují jedinečnou strukturální hierarchii díky jejich biologickému původu [8]. V buněčné stěně rostlin je celulóza hlavní polysacharid. Tento polysacharid je nevětvený a skládá se z glukopyranózových jednotek spojených β -1,4-glykosidickou vazbou [9]. Tyto tenké a dlouhé celulózové makromolekuly jsou spojovány do kompaktních a velmi pevných svazků, které se nazývají celulózové mikrofibrily o průměru 10–25 nm (Obr. 1). Celulózové mikrofibrily jsou složeny z 50–70 vláken celulózy.

Vazbou celulózových vláken vzniká nerozpustný a krystalický materiál. Vlákna jsou propojena vodíkovými můstky a na tyto řetězce se mohou navázat i molekuly jiných polysacharidů. Právě díky tomu získávají molekuly celulózy v mikrofibrilách tak pravidelné uspořádání. Mikrofibrily pak dále vytváří tzv. makrofibrily s tloušťkou 0,5 μ m a délkou až 4 μ m. Jejich pevnost je obrovská a odpovídá pevnosti ocelového drátu stejného průměru [10].



Obr. 1: Struktura celulóзовého vlákna, se znázorněním celulóзовých mikrofibril a polysacharidového řetězce [7].

2.2.2 Pektin

Pektin je jednou z hlavních složek primárních buněčných stěn všech rostlin [11]. Hlavní řetězec pektinu tvoří kyselina galakturonová, která existuje jako lineární homopolymer (homogalakturonan), nebo má na sobě navázané složité postranní řetězce (rhamnogalakturonan-II). Též může mít na základním stavebním řetězci střídavě navázanou ramnosu s arabinanem, galaktanem nebo arabinogalaktanem (rhamnogalakturonan-I) [12].

Jde o vysoce hydrofilní polysacharidy, přirozeně se vyskytující jako polyanionické polymery [11, 13]. Vzhledem k jejich charakteru a regulovanému stupni esterifikace jsou

citlivé na kationty. Pektinové molekuly jsou schopné se vázat přes vápníkové můstky (Ca^{2+}) k mastným kyselinám. Chování těchto agregátů je řízeno stupněm nabití pektinu a také koncentrací vápníku [14].

Taktéž se zjistilo, že hemicelulóza xyloglukan (XG) může být připojena k polymeru pektinu [15]. Existuje i více studií, které poukázaly na schopnost těchto polysacharidů vázat se i s jinými sacharidovými složkami rostlinných buněčných stěn.

2.2.3 Hemicelulózy

Hemicelulózy představují skupinu rozvětvených polysacharidů, které jsou strukturně podobné celulóze. Jejich základní řetězec je složený převážně z hexóz, jako je například manosa, glukóza, galaktóza. Struktura a výskyt hemicelulóz se liší u různých taxonomických skupin rostlin [16].

Jde o druhý nejhojnější biopolymer v rostlinné říši po celulóze. V závislosti na typu rostliny a složení její buněčné stěny, má hemicelulóza různé procentuální zastoupení. Například ve stéble pšenice nebo ječmene je hemicelulóza zastoupena z 32 %, ve stéble ovsu pak najdeme 27 %, v žitném stéble 31 %, v rýžovém stéble 25 %, ve slunečnicovém lusku 23 %. Ve slupce z cukrové třtiny najdeme 22 % hemicelulózy a 37 % hemicelulózy je obsaženo v kukuřičném klasu.

Hemicelulózy se na základě odlišného typu polysacharidu většinou dělí do čtyř základních skupin a to na xyloglukany, manoglykany, xyloglykany a různě vázané β -glukany [17].

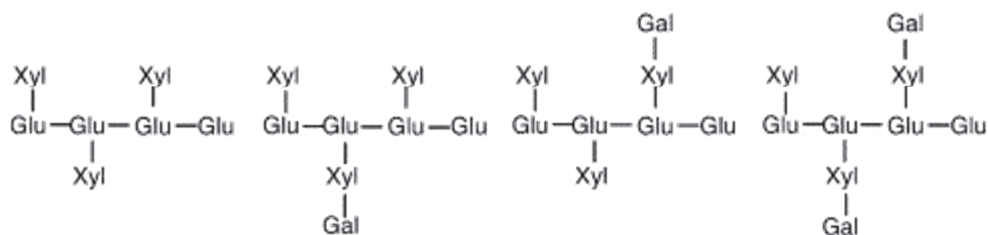
Hemicelulózy vytváří matrix, který se poté váže na celulózové mikrofibrily. V primárních buněčných stěnách u dvouděložných rostlin je převládajícím typem XG, u jednoděložných rostlin xylan [10]. Hlavní řetězec xylanu je složený z xylózových zbytků, které jsou ve formě pentóz. Boční řetězce pak tvoří především arabinóza, galaktóza nebo glukóza. [17].

2.3 Xyloglukan

2.3.1 Struktura xyloglukanu

XG je polysacharid hemicelulózy, který se nachází v primárních buněčných stěnách všech vyšších rostlin. Tvoří většinou okolo 20–25 % suché hmotnosti primární buněčné stěny [18]. XG hraje důležitou roli především při kontrole buněčného růstu, slouží také jako rezerva uhlíku v semenech mnohých dvouděložných rostlin [19].

Základní řetězec XG je kvalitativně shodný s celulózou a jeho hlavní řetězec je složen z β -1,4-D-glukopyranózových jednotek. Za základní stavební jednotku XG bývají považovány čtyři spojené molekuly glukózy (Obr. 2) [18]. Asi 75 % glukózových zbytků je substituováno D-xylopyranózou přes α -1,6- vazbu. Na tyto postranní řetězce mohou být navázané zbytky D-, L-galaktopyranózy a L-arabinózové zbytky [20].



Obr. 2: Základní řetězec XG, Glu = glukózové jednotky, Xyl = xylózové jednotky, Gal = galaktózové jednotky [21].

2.3.2 Nomenklatura xyloglukanu

Fry a kol. (1993) zavedli nomenklaturu pro XG, kde každý substituovaný β -D-glykozylový zbytek je označen jedním písmenem, které představuje určitou monosacharidovou strukturu. Název těchto oligosacharidů je sestaven z písmen reprezentujících glykozylové zbytky ve směru od neredukujícího k redukujícímu konci sacharidu. Toto kódování je uvedeno v Tab. 1 [22].

Tab. 1: Nomenklatura složení XG; redukující glukózový zbytek, který je převeden na alditolový zbytek se označuje kódem „Gol“ [22]:

	α -L-Fucp 1 ↓ 2 β -D-Galp 1 ↓ 2 α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	β -D-Galp 1 ↓ 2 α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	α -L-Galp 1 ↓ 2 β -D-Galp 1 ↓ 2 α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	α -L-Araf 1 ↓ 2 α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	β -L-Araf 1 ↓ 3 α -L-Araf 1 ↓ 2 α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp	α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp 2 ↑ 1 α -L-Araf	α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp 2 ↑ 1 β -D-Xylp	α -D-Xylp 1 ↓ 6 β -D-Glcp 2 ↑ 1 α -L-Araf	D-Glcol
G	F	L	X	J	S	T	A	B	C	Gol

2.4 Celulózo–xyloglukanová síť

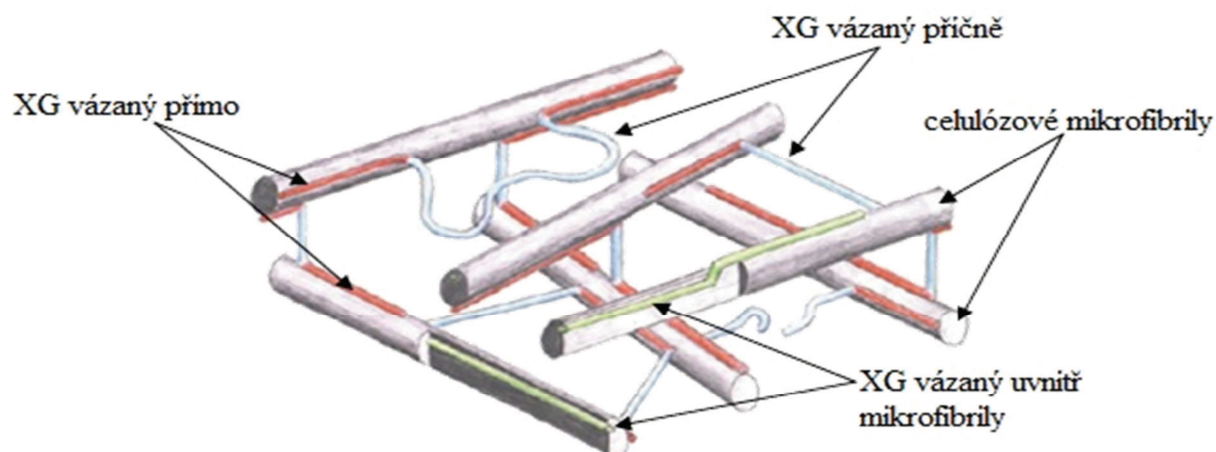
XG tvoří vazby s celulóзовými mikrofibrily za vzniku 3D struktury, celulózo-xyloglukanové sítě. Tato síť má funkci nosné konstrukce buněčné stěny zaručující buňce pevnost a tím pádem i odolnost vůči vnějšímu tlaku [23]. Roztržení buňky se brání pomocí osmotického tlaku a ten je kompenzován turgorovým tlakem.

Polymery XG a celulózy se spojují nekovalentně vodíkovou vazbou [24]. Jelikož tato struktura má význam pro rostlinné buněčné stěny, byla jí věnována značná pozornost.

Zjistilo se, že přibližně 8 % buněčné stěny tvoří XG, který není navázán přímo na povrch celulózy, ale vytváří s ní křížové vazby (cross-links). K uvolnění tohoto XG došlo pomocí působení XG-specifickou endoglukanázou (XEG) na buněčnou stěnu.

XG který je navázán na povrch celulóзовých mikrofibril tvoří 10 % buněčné stěny. Tento XG byl uvolněn až po působení XEG a koncentrovaného KOH.

Další 3 % tvoří XG, který se nachází vevnitř nebo mezi celulóзовými mikrofibrilami, uvolňuje se až po konečném štěpení buněčných stěn celulázou a po působení KOH a XEG (Obr. 3) [25].



Obr. 3: Celulózo-xyloglukanová síť; způsoby vazby XG na celulóзовé mikrofibrily [25].

2.5 Modifikace buněčné stěny

Nyní je už dobře zdokumentováno, že buněčná stěna je metabolicky aktivní a uvnitř dochází nejen k biosyntéze nebo degradaci, ale i k vratným a nevratným modifikacím. Tyto procesy jsou především významné pro celkový metabolismus buňky [1]. V průběhu diferenciaci mohou buňky zvětšovat svoji velikost nebo měnit svůj tvar. Kvůli tomuto důvodu dochází k restrukturalizaci buněčné stěny. Roztahování nebo prodlužování buňky se odráží na změně tlaku a pevnosti buněčné stěny. Aby se udržela její síla v průběhu zvětšování buňky, musí docházet ke kontinuální inkorporaci nového materiálu. Strukturální změny stávající buněčné stěny jsou zprostředkovány různými enzymy. Ty pomáhají rostlinám přizpůsobit se změnám v životním prostředí například tím, že regulují růst a hlídají vstup biotických činitelů [26].

Právě za proces růstu buněčné stěny je zodpovědná celá skupina enzymů typu glykanáz, glykozidáz a transglykozyláz. Glykanázy a glykozidázy představují enzymy, které se účastní hydrolýzy hlavních složek buněčného matrixu [24].

Na modifikaci buněčné stěny se podílí i expanzin (fytohormon), který je důležitý pro správnou funkci rostlinného pletiva a pro rozvolňování buněčné stěny [27]. Spolu s hydrolytickými enzymy, které mají optimum svojí aktivity při nízkém pH, způsobí uvolňování vodíkových můstků mezi polysacharidy buněčné stěny. Buněčná stěna se pak roztahuje a buňka roste [28]. V primární buněčné stěně je expanzin pravděpodobně zodpovědný za kontrolu růstu regulací dostupnosti glykanu pro jiné enzymy, které jsou schopné modifikovat buněčnou stěnu [27].

Auxin je fytohormon, který reguluje prodloužení, dělení, diferenciaci a morfogenezi buňky [29]. Detailní mechanismy, kterými auxin reguluje tyto základní buněčné odezvy nejsou stále zcela pochopeny [30]. Jeho účinkem pravděpodobně dochází k snížení pH buněčné stěny a tím se aktivují enzymy potřebné pro její modifikaci [31].

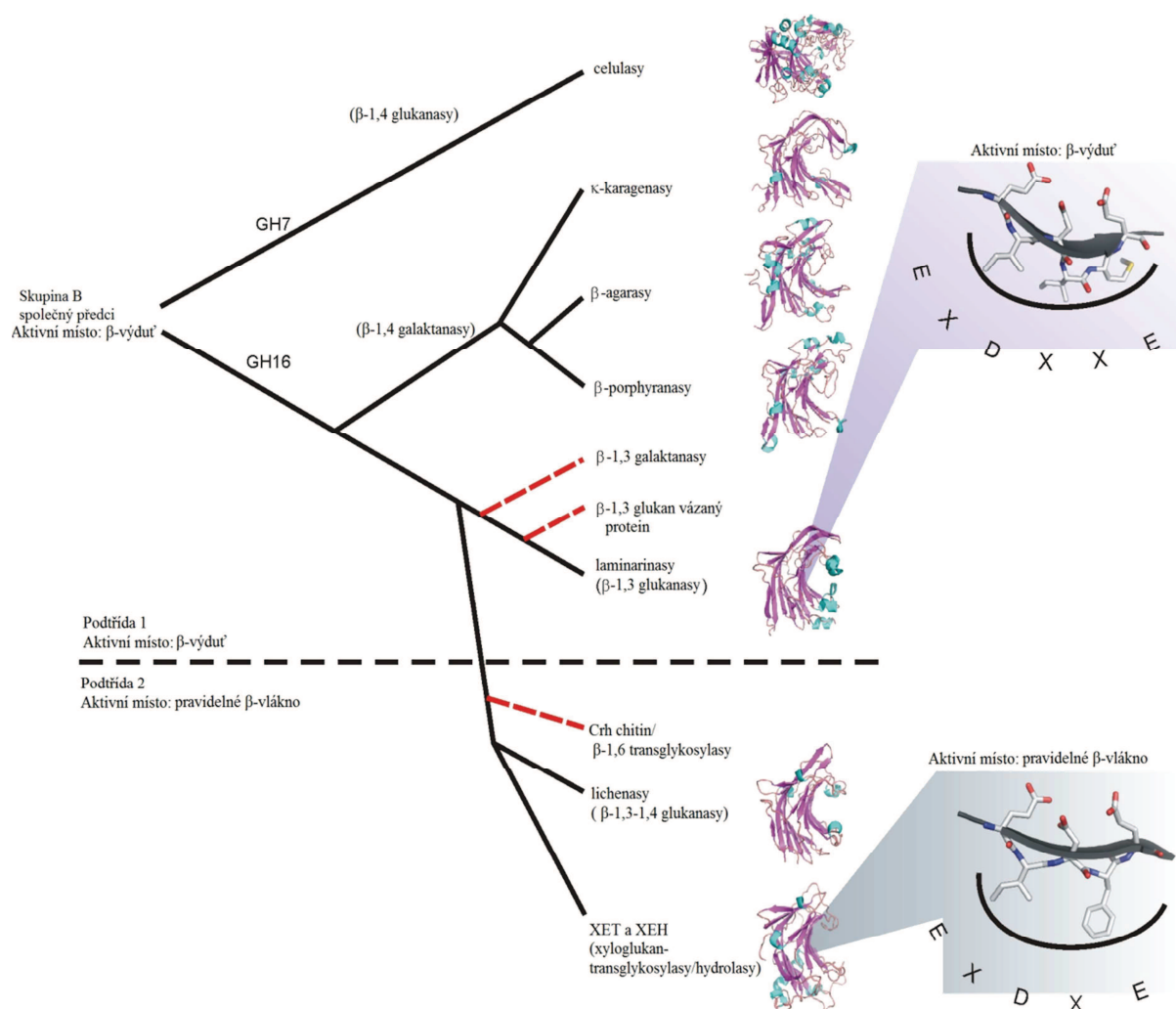
2.6 Xyloglukan endotransglykozyláza

Tranglykozylázy představují skupinu enzymů, které významně přispívají k restrukturalizaci buněčné stěny. Dodnes byly charakterizovány v rostlinách čtyři enzymy katalyzující transglykozylační reakci. A to xyloglukan endotransglykozyláza (XET) [32, 33, 34] manan endotransglykozyláza/hydroláza [35], β -glukan:xyloglukan endotransglykozyláza [36] a xylan endotransglykozyláza/hydroláza (endoxylanáza) [37].

Enzym XET byl objevený třemi vědeckými skupinami současně, v různých rostlinných zdrojích. Původně se tento enzym považoval za xyloglukan endotransglykozylázu/hydrolázu (XTH). Dnes už se ale ví, že existují dvě různé skupiny enzymů [38]. Transferázová aktivita (XET, xyloglukan:xyloglukozyl transferáza, EC 2.4.1.207) vede k nehydrolytickému štěpení a ligaci XG, zatímco xyloglukan endohydrolázová aktivita (XEH xyloglukan-specifická endo- β -(1,4)-glukanáza, EC 3.2.151) katalyzuje nevratné zkracování řetězce XG. Hrmová a kol. (2009) vytvořili fylogenetický strom, v kterém tyto enzymy rozdělili do třech podrodin [39].

Enzym xyloglukan endotransglykozyláza se podle databáze Carbohydrate-Active enzymes (CAZY, www.cazypedia.org) řadí do glykozylyhydrolázové rodiny 16 (GH16) [40]. Rodina GH16 je relativně různorodá a enzymy, které do ní patří, působí na široké spektrum substrátů. Patří sem β -agarázy, endo-1,3- β -glukanázy (laminarinázy), endo-1,3/1,4- β -glukanázy (lichenázy), κ -karaginázy a endotransglykozylázy [41].

Rodina GH16 je členem klanu B (GH-B) společně s glykozylyhydrolázovou rodinou 7 (GH7) (Obr. 4). Různé specifika rodiny GH16 byly vyvinuty z původní β -1,4-glukanázy [42]. Enzymy z enzymatické rodiny GH16 štěpí β -1,4- nebo β -1,3-glykosidické vazby v různých glukanech a galaktanech [40].



Obr. 4: Dělení klanu GH-B do enzymových rodin GH16 a GH7 [40].

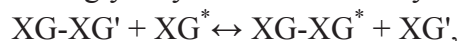
2.6.1 Mechanismus transglykozační reakce katalyzované xyloglukan endotransglykozylázou

XET katalyzuje štěpení molekul XG pomocí transglykolyzačního mechanismu, který zahrnuje několik kroků [43]:

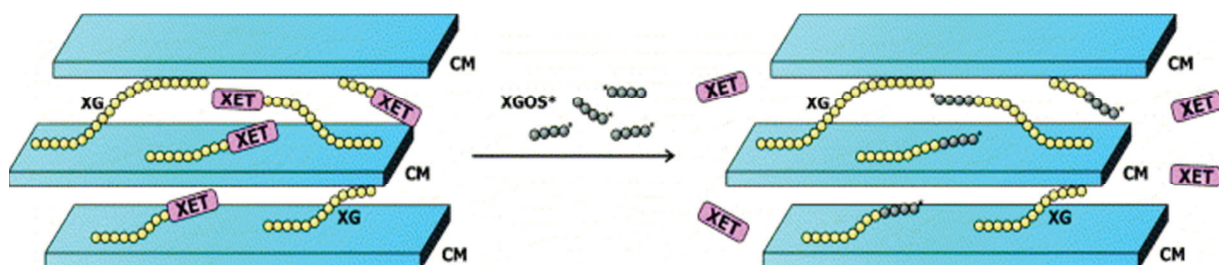
1. asociace molekuly XET s molekulou XG
2. štěpení XG a uvolnění části molekuly obsahující původní redukující konec; tvorba kovalentně vázaného komplexu enzymu s molekulou XG, která obsahuje nově vytvořený redukující konec
3. asociace XET-XG komplexu s molekulou akceptoru (xyloglukan oligosacharidy, oligosacharidy odvozené od XG (XGOS)) za tvorby přechodného komplexu doprovázeného transglykozylací
4. disociace komplexu na produkt transglykozační reakce a volný enzym, během této sekvence enzym existuje ve dvou stabilních formách: ve volné formě nebo jako kovalentně glykozylovaný meziprodukt.

Tento sled reakce odpovídá ping-pongovému reakčnímu mechanismu, kdy po navázání prvního substrátu dojde k vytvoření, uvolnění prvního produktu a k vytvoření substituované formy enzymu. Následně se naváže druhý substrát, dojde k vytvoření kovalentní vazby mezi substráty a k uvolnění druhého produktu [44].

Transglykozylační reakce katalyzovaná XET lze schématicky zapsat ve tvaru:



Kde $\text{XG-XG}'$ je donor reakce, který obsahuje redukující konec. Molekula XG^* je akceptorem reakce, která může být buď XG nebo XGOS^* [45]. Při reakci vzniká hybridní produkt a zbytek polymeru (donoru reakce); (Obr. 5).



Obr. 5: Mechanismus působení XET na molekuly XG , které se nachází mezi celulóзовými mikrofibrilami. CM – mikrofibrily celulózy, XG – xyloglukan, XGOS^* – (značené) xyloglukan oligosacharidy [46].

2.6.2 Funkce xyloglukan endotransglykozylázy

Existuje mnoho izoform rostlinného enzymu XET a tedy i více genů kódujících tento enzym. XET se vyskytuje v odlišných pletivech v různém období růstu rostliny. Což způsobuje její rozličné funkce.

XET se podílí například na selektivní modifikaci buněčných stěn rostlin během růstu, jde o potenciální katalyzátor v různých reakcích [47], dále se podílí na rozvolňování buněčných stěn v průběhu růstu, prodlužování buňky a zpevňování buněčných stěn [32].

Enzym XET má významnou a různorodou roli v metabolismu XG během jeho syntézy, a taky ve vývoji a stárnutí rostlinné buňky [48]. Experimentální údaje ukazují, že podstatná část XET se nachází v primárních stěnách rostlinných buněk, v těsné blízkosti jeho substrátu XG . Posledním objeveným jevem je schopnost heterotransglykozylace, kdy XET tvoří vazby mezi různými typy polysacharidů [46].

Mnohé XET enzymy z řad vyšších rostlin byly již charakterizovány a obvykle jsou kódovány geny, které patří do velké specifické rodiny s tkáňovou specifitou a růstovým stupněm závislým na expresi.

Geny kódující zástupce XET byly charakterizovány ve velkém počtu plodů ovoce jako například v kiwi, hroznech, jablkách, hruškách a mimo jiné i v rajčatech nebo sóji [48,49]. Z rýže bylo například izolováno 29 genů pro XET enzymy. Brukvovitá rostlina huseníček například obsahuje komplexní genové rodiny skládající se z více než 20 XET genů [50].

Geny pro XET můžeme najít i v ječmenu [51]. Studie také ukázaly, že třicet šest genů enzymů XET se nachází i v topolech. Více izoenzymů ze stejné rostliny se liší buďto nepatrnými rozdíly v enzymové aktivitě, nebo různou expresí [52,53].

Pro izolaci a namnožení genů XET se využívají hostitelské organismy jako například kvasinka *Pichia pastoris* [54, 55] nebo vyjímečně buňky hmyzu.

XET byla izolována například z čočky, mungo fazolí, lichořeřišnicových semen, tamaryšku, z petržele nebo také z květů kvěťáku [56]. Například v semenech lichořeřišnice

je XET pravděpodobně zodpovědná za uvolnění uloženého XG, který má důležitou roli při výživě sazenice [57]. Funkce XET byla pozorována i u rýže, kde pravděpodobně ovlivňuje plasticitu buněčné stěny, což má za následek prodlužování buněk [50].

Jelikož se XET akumuluje v epidermálních pletivech nejen při růstu, ale i v průběhu mechanického stresu, může přispívat ke zpevnění buněčné stěny a tím minimalizovat poškození buněk a pletiv. XET je schopná i částečné lyze buněčné stěny čímž umožní tvorbu xylémových a floémových spojovacích pletiv [58].

2.6.3 Biochemická charakterizace XET

Každý enzym má své optimální podmínky pro svoji aktivitu a funkci v buňkách, které zahrnují pH optimum, teplotní optimum, termostabilitu apod. K základním charakteristikám enzymů patří i jejich izoelektrický bod (pI). Pokud existuje více izoform jednotlivých XET v rostlině, jejich funkce může být různá v závislosti na jejich lokalizaci v rostlinném pletivě. Každý takovýto enzym, resp. jeho izoforma může vyžadovat různé pH nebo teplotu pro svoji funkci. Navíc funkce i aktivita enzymu bývají často ovlivňovány i hormonálními a environmentálními stimuly [59].

Například bylo zjištěno, že XET obsažená v hrachové lodyze má hodnotu pI 8,1 [60]. XET získaná z tamaryšku má naopak hodnotu pI 5 [57]. Dalším příkladem je ječmen, kdy hodnota pI u přečištěného izoenzymu XET izolovaného z ječmene (HvXET6) byla určena v rozmezí 5,9–6,5. Další izoformy XET nalezené v ječmeni pak měly pI hodnoty 7,2; 6,7 a 8,4 [39]. Například enzym XET nalezený v lichořeřišnici má izoelektrický bod s hodnotou pI 5,14 [61]. Další studie naopak uvádí, že u naklíčených semen lichořeřišnice větší byly zaznamenány čtyři majoritní formy pI 4,7; 5,5; 6,3 a 6,9; dále bylo zaznamenáno asi sedm minoritních forem s hodnotami pI v rozmezí 4,4 až 9,6 [62]. Jedním z možných vysvětlení výskytu tak velkého množství izoform XET je, že se odlišují v místě ataku molekuly donorového substrátu [56]. Kdy substrátová specifita je jedním ze základních rozdílů mezi jednotlivými izoenzymy XET [63].

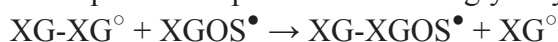
Pomocí studií byly zjištěny i hodnoty pH. Například XET izolovaná ze zrajících plodů kiwi je aktivní v rozmezí pH od 5,0 do 8,0 s optimem mezi 5,5–5,8 [48, 54]. U nepřečištěné XET získané z hrachu bylo stanoveno pH optimum na 5,5; u mungo fazolí se pH optimum pohybovalo od 5,8 až 6,0. pH optimum XET získané z květu kvěťáku se pohybovalo okolo 5,0–5,5 ačkoli různé izoformy XET dosahovaly hodnot až pH 6,5 nebo 7 [54]. Jak již bylo vzpomenuo i semena tamaryšku obsahují XET, zde je optimum pH 4,5–5,0 a teplotní optimum 40 °C [55].

U houseníčku bylo stanoveno teplotní optimum u směsi izoenzymů XET na 30 °C [64]. Izoenzym XET izolovaný z ječmene (HvXET5) měl teplotní optimum 28 a 30 °C [65]. Teplotní optimum XET získané ze semen lichořeřišnice bylo stanoveno na 42 °C [66].

2.6.4 Metody na detekci a stanovení XET a XEH aktivit

Existuje více metod na stanovení XET nebo XEH aktivity. Jedněmi z nich jsou metody založené na stanovení změn fyzikálně-chemických veličin, sem patří kolorimetrická nebo viskozimetrická metoda.

Kolorimetrická metoda popsaná v práci Z. Sulové a kol. (1995) je založena na schopnosti XGOS selektivně stimulovat štěpení XG v procesu endotransglykozylační reakce.



Depolymerizace XG se v tomto případě měří jako pokles modro-zeleného zbarvení komplexu jód-XG. Transglykozylační aktivita se vypočte jako rozdíl aktivit měřených v přítomnosti a absenci XGOS. Výhody popsané kolorimetrické metody jsou nízké náklady, jednoduchost, rychlost a možnost analyzovat více vzorků současně [67].

Viskozimetrická metoda je velmi citlivá a často se využívá ke stanovení aktivity mnoha endoglykanů. Jejichž účinek je spojený se snižováním molekulové hmotnosti a tedy i s poklesem viskozity polymerních roztoků v důsledku transglykozylační/hydrolytické reakce. Aktivita XET je tedy vyjádřena jako rozdíl v poklesu viskozity v přítomnosti a nepřítomnosti XGOS popř. XG.

V porovnání s viskozimetrickou metodou je kolorimetrické stanovení zhruba 10× citlivější, také je mnohokrát rychlejší. Viskozimetrická metoda na druhou stranu poskytuje z hlediska citlivosti a rychlosti porovnatelné výsledky s radiometrickým stanovením aktivity [67, 68].

Na stanovení aktivity XET a XEH enzymů existují i metody využívající různě značené oligosacharidy sloužící jako akceptorové substráty. Ty mohou být značené radioaktivně nebo fluorescenčně.

U radiometrické metody se nejčastěji využívají tritiem [^3H] nebo radioaktivním izotopem uhlíku [^{14}C] značené oligosacharidy. Výhodou obou metod je tvorba značeného hybridního produktu, který je na rozdíl od donoru radioaktivní/fluorescenční a na rozdíl od akceptoru má vyšší molekulovou hmotnost [32, 69]. Sloučeniny se značeným fluorescenčním chromoforem jsou široce využívány jako substráty nebo markery v různých oblastech biologického výzkumu. Výhodou fluorimetrické metody je vysoká citlivost, bezpečnost a relativně nízké náklady ve srovnání s radiometrickými metodami.

Nejvíce využívaným nástrojem pro detekci transglykozylační aktivity jsou sulforodaminem (SR) značené oligosacharidy (především XGOS) [69]. Papírovou metodu dot-blot („tečka-skvrna“) prvně popsal Fry ve své práci (1997). Jde o rychlé a semikvantitativní stanovení XET aktivity. Test je proveden tak, že filtrační papír Whatman č. 1 je impregnovaný směsí XG a fluorescenčně značeného XGOS s SR (XGOS-SR). Transglykozylační reakce katalyzovaná XET produkuje xyloglukan-sulforodaminové konjugáty. Testovací papír Whatman č. 1, na kterém jsou naneseny vzorky je nakonec omyt, aby se odstranily nezreagované oligosacharidy. Nevymyté fluorescenční stopy, reprezentující vzniklý fluorescenční hybridní produkt, jsou navázané na papírovou matici pomocí vodíkových můstků [70].

Transglykozylační aktivity mohou být identifikované i chromatograficky. Metoda gelové permeační chromatografie (GPC) byla využita například u tamaryšku a Kurbarylu obecného [71, 72]. GPC se využívá na kvantifikaci transglykozylační reakce sledováním změn v molekulové hmotnosti substrátů, jejichž reakcí dochází k tvorbě produktů s vyšší hmotností. GPC může být spojena s amperometrickým nebo fluorescenčním detektorem [33].

2.6.5 Heterotransglykozylační reakce

V posledních letech se zjistilo, že XET je schopná katalyzovat i heterotransglykozylační reakce. Ty představují reakci mezi sacharidy různého typu. Na stanovení transglykozylačních aktivit se většinou využívají značené oligosacharidy.

Například v práci Evy Stratilové a kol. (2010) byla detekována XET s heterotransglykozylační aktivitou v proteinovém extraktu z naklíčených semen Lichořeřišnice větší. Byl využit XG nebo hydroxyethylcelulóza (HEC) jako donor reakce. Akceptory reakce byly laminariooligosacharidy (LAOS), β -1,3/1,4-D glukooligosacharidy (MLGOS), xylooligosacharidy (XYLOS) pustulooligosacharidy (PUOS) a XGOS. U všech donor-akceptorových párů se zaznamenala heterotransglykozylační aktivita. Pouze při práci s oligouronovou kyselinou (OUA), která sloužila jako akceptor, aktivita zaznamenaná nebyla [66].

Ait Mohand a Farkaš (2006) detekovali, při použití extraktu z naklíčených semen lichořeřišnice, heterotransglykozylační aktivitu pro páry XG/xyloglukan oligosacharidy značené SR (XG/XGOS-SR), HEC/XGOS-SR, XG/celooligosacharidy značené SR (XG/CEOS-SR) a XG/laminariooligosacharidy značené SR (XG/LAOS-SR) [73].

V surovém proteinovém extraktu získaném z Lichořeřišnice větší, detekoval Ondřej Kosík (2010) heterotransglykozylační aktivity například pro donor-akceptorové páry XG/XGOS, XG/celooligosacharidy (CEOS), XG/LAOS, XG/galaktomanoooligosacharidy (GMOS), XG/MLGOS, HEC/XGOS, HEC/CEOS a HEC/MLGOS. Při použití proteinového extraktu z Houseníčku rolního, se mu podařilo detekovat transglykozylační aktivitu pro donor-akceptorový pár XG/XGOS a heterotransglykozylační aktivitu pro pár XG/XYLOS [74].

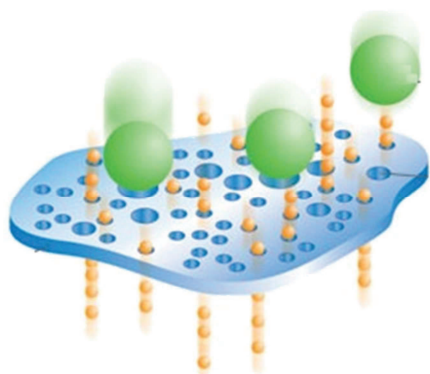
Hrmová a kol. (2009) použili purifikovaný proteinový extrakt z ječmene a stanovili heterotransglykozylační aktivitu pro donor-akceptorové páry XG/MLGOS a XG/CEOS [65].

Ve studii Garajové a kol. (2008) byl použit částečně přečištěný proteinový extrakt s XET, získaný z kořenů petržele. Tato studie potvrzuje průběh transglykozylační reakce pro pár XG/XGOS, kde aktivita reakce vzrůstá se vzrůstajícím pH optimem. Nejednoznačných výsledků pro heterotransglykozylační reakci bylo dosaženo u páru XG/CEOS a XG/LAOS [75].

2.7 METODY

2.7.1 Dialýza

Dialýza se řadí mezi separační techniky. Jde o oddělení látek přes semipermeabilní membránu selektivní a pasivní difúzí (Obr. 6). Roztok pufru se nazývá dialyzát, je v 100 až 500× násobném objemu vzorku. Vzorek a dialyzát jsou umístěny na opačných stranách membrány. Molekuly ze vzorku, které jsou větší než póry v membráně neprocházejí membránou do dialyzátu. Naproti tomu malé molekuly projdou volně přes membránu, čímž



se snižuje jejich koncentrace ve vzorku. Po určité době (kdy dojde k vyrovnání koncentrací malých molekul schopných projít přes membránu), je třeba vyměnit dialyzační roztok za nový a tím podpořit separaci. Samotná dialýza funguje pomocí difúze, což je proces, který je výsledkem tepelného nebo náhodného pohybu molekul a způsobuje pohyb molekul z oblasti vyšší koncentrace do nižší dokud se nedosáhne rovnováhy [76].

Obr. 6: Princip dialýzy, prostup analytu semipermeabilní membránou [76].

2.7.2 Lyofilizace

Pro uchování a skladování je potřeba biologické materiály stabilizovat nebo konzervovat například vysušením. Sušení ale občas způsobuje ztrátu aktivity vzorku popřípadě jeho jiné poškození. Lyofilizace též nazývaná vymrazování nebo vakuové sušení, je metoda sušení, u které se značně redukuje možnost poškození analytu. Jelikož je lyofilizace jedna z nejkomplexnějších a nejnákladnějších forem sušení, je její využití většinou omezeno pouze pro citlivé nebo drahé analyty [77].

Lyofilizace probíhá v několika etapách.

První etapou je mražení:

Při tomto kroku se analyt zmrazí pod eutektický bod, což je teplota při které může analyt existovat jen v pevném skupenství. Většinou se materiál mrazí za atmosferického tlaku na teplotu -15 až -50 °C. Rychlost mražení ovlivňuje velikost krystalů (pomalé mražení znamená vznik velkých krystalů, rychlé chlazení vznik malých krystalků, vhodnější způsob).

Druhým krokem je primární sušení:

Po zmražení materiálu se zahájí sublimace ledu postupným zvyšováním tlaku až do doby kdy začne led sublimovat. Hodnota vakua se obvykle pohybuje v oblasti několik desítek až stovek Pa. Aby vzniklé páry nesnižovaly hodnotu vakua, musí být rychle odváděny. Jelikož sublimace vyžaduje dodání skupenského tepla musí být zmražený materiál lokálně ohříván. Množství dodaného tepla však musí být takové, aby stačilo ke správnému průběhu sublimace, ale zároveň nesmí docházet k tání materiálu. Ztráta vody z materiálu se pohybuje okolo 95 %.

Poslední fází je sekundární sušení:

V tomto kroku se odstraňuje zbytková vlhkost. Teplota se postupně zvyšuje na/nad 0 °C a dochází k vakuovému sušení. Na konci této etapy obsahuje vzorek pouze několik málo % (velice často i méně než 1 %) vlhkosti. Závěr lyofilizace je opatrné vyrovnaní tlaku, tedy zrušení vakua [78].

2.7.3 Elektromigrační metody

Elektromigrační metody spadají do separačních analytických metod. Jsou založeny na rozdílné mobilitě nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Mezi nejvýznamější faktory ovlivňující mobilitu částic patří:

- *fyzikálně chemické vlastnosti samotných částic*
- *vlastnosti prostředí*
- *vlastnosti nosiče*
- *vlastnosti elektrického pole*

Na velikost náboje má vliv například stupeň ionizace, iontová síla a pH prostředí [79]. Do elektromigračních metod patří například zónová elektroforéza, izotachoforéza a izoelektrická fokusace [80].

2.7.3.1 Elektroforéza

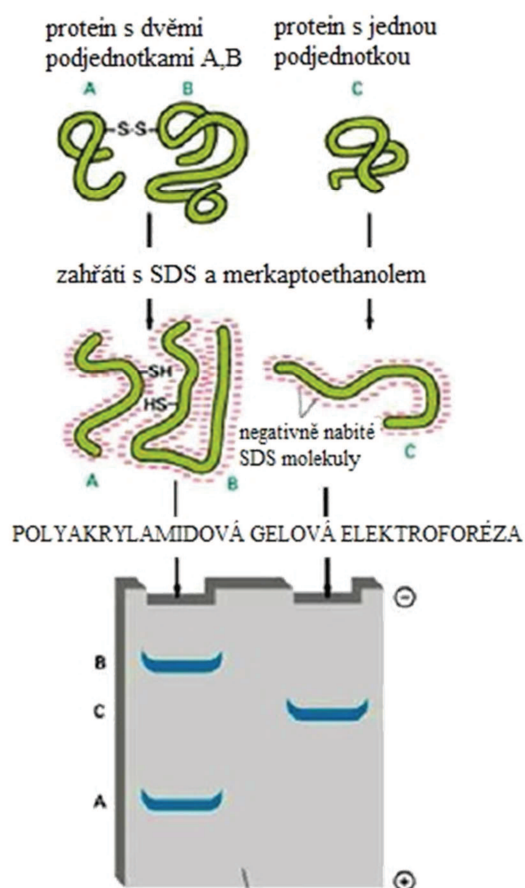
Elektroforéza spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. Elektrické pole je vytvořeno vkládáním konstantního stejnosměrného napětí mezi elektrody. Látky se dělí na základě rozdílných rychlostí pohybu v elektrickém poli.

Spadá sem elektroforéza s pohyblivým rozhraním, zónová elektroforéza, gelová elektroforéza nebo kapilární elektroforéza [81]. Díky odlišným fyzikálně-chemickým vlastnostem migrují různé makromolekuly směsi během elektroforézy různými rychlostmi a dělí se tak do jednotlivých spotů [82].

SDS Elektroforéza

Nejčastěji používanou metodou je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE). Experimentální uspořádání elektroforézy v polyakrylamidovém gelu je dvojího typu: méně používaná elektroforéza v trubičkách nebo elektroforéza v plošném uspořádání, která se hojně využívá. Plošná elektroforéza se provádí horizontálně (gelová deska je v přístroji umístěna ve vodorovné poloze), nebo vertikálně (deska je kolmo na podložku) [83].

SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza se využívá k separaci proteinů na základě jejich velikosti (molekulové hmotnosti). Přídavkem SDS (dodecylsulfát sodný) získávají proteiny vysoký záporný náboj, který je přímo úměrný jejich hmotnosti. Po nanesení proteinu na gel, který se nachází v elektrickém poli dojde k migraci proteinů k anodě. Během této migrace jsou proteiny děleny na principu molekulového síta v polyakrylamidovém gelu (Obr 7) [84].



Následně se pokračuje vizualizací separovaných proteinů v gelu. Relativní molekulovou hmotnost určujeme srovnáním se standardem, který obsahuje proteiny o známé molekulové hmotnosti. Dle velikosti proteinů, které chceme separovat se volí koncentrace akrylamidu/bis-akrylamidu použitého k přípravě gelu. Vysoká koncentrace se využívá k separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti a naopak nízké koncentrace polyakrylamidu se využívá k separaci proteinů o vysoké molekulové hmotnosti. Mobilita komplexu SDS-bílkovina v polyakrylamidovém gelu je přímo úměrná logaritmu molekulové hmotnosti příslušného proteinu. Touto metodou stanovené hmotnosti bílkovin jsou všeobecně uznávány pro účely charakterizace bílkovinného preparátu. Značnou nevýhodou však je, že vazbou SDS na bílkovinu ve většině případů dochází ke ztrátě biologické aktivity bílkoviny [83, 84].

Obr. 7: Princip separace proteinů pomocí SDS-PAGE [85].

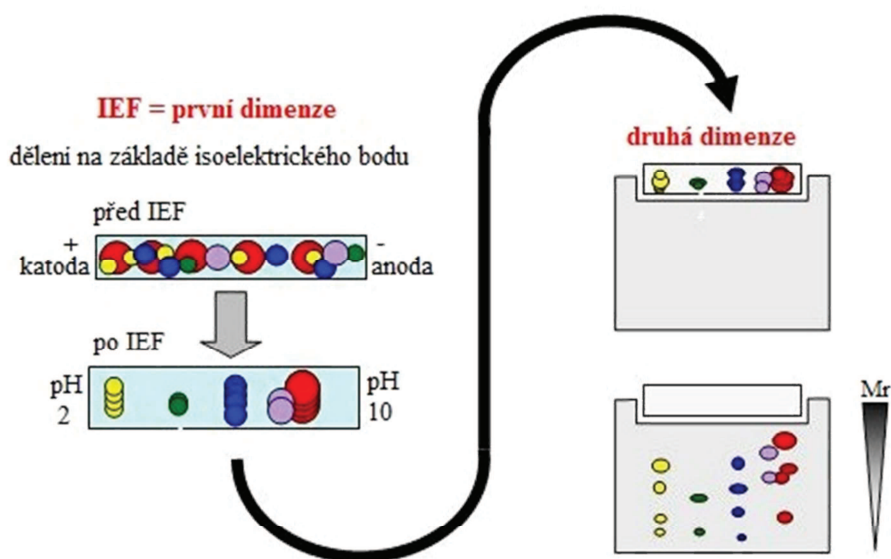
2.7.3.2 Izoelektrická fokusace (IEF)

Izoelektrická fokusace se řadí mezi elektromigrační metody. Jejím hlavním uplatněním je separace látek amfoterního charakteru, které se liší hodnotou izoelektrického bodu, tj. velikostí pH, při kterém náboj látky nabývá nulové hodnoty. Základním předpokladem pro IEF je přítomnost gradientu pH podél kolony vytvořeného pomocí amfolytů, které účinkem elektrického pole putují na místa svých izoelektrických bodů. A právě tím se mezi katodou a anodou vytvoří stálý gradient pH. Kdy nejnižší pH je u anody a nejvyšší u katody [79].

Po vložení elektrického pole se začnou amfolyty pohybovat k anodě nebo ke katodě, dokud se nedostanou do oblasti pH, která odpovídá jejich izoelektrickému bodu. V něm se zastaví a nakoncentrují se zde, zafokují, do velmi tenké zóny [86].

Většina IEF se provádí horizontálně, s pomocí polyakrylamidových gelů s nízkou porozitou, která dovoluje migraci proteinů. Tato metoda je schopna oddělit komponenty, které se liší o 0,005 pH jednotku nebo i méně. Záleží jaké amfolyty se zvolí k rozvoji stabilního pH gradientu [87].

Většinou se po IEF pokračuje na druhý rozměr (Obr. 8), kdy se získaný proužek gelu po IEF s pásy imobilizovaným pH gradientem nanese na polyakrylamidový gel a analyt se dále dělí na základě molekulové hmotnosti pomocí gelové elektroforézy [88].



Obr. 8: Schéma znázorňující IEF a následnou elektroforézu [88].

Vizualizace separovaných látek

Kvůli tomu, že většina separovaných látek je bezbarvá, je nutné po proběhnutí elektroforetické metody zařadit tzv. vizualizaci, neboli zviditelnění příslušných složek směsi. Na tomto kroku je značně závislé i konečné rozlišení separovaných látek. Nejčastěji se využívají barevné reakce. Technikám vizualizace byla věnována značná pozornost, nejpropracovanější jsou pravděpodobně techniky vizualizace bílkovin a nukleových kyselin.

Například pro vizualizaci bílkovin se nejčastěji používá adsorpce barviva (amidočerni, methylenové modři, Coomassie blue) na povrch bílkoviny. Kdy po proběhnutí například elektroforézy nebo IEF se gel po skončení ponoří do roztoku příslušného barviva a pak se několik hodin vypírá například ve zředěné kyselině octové. K odbarvení barviva nedojde pouze v místech, kde je barvivo pevně adsorbováno na bílkovinu. Z ostatních částí gelu se barvivo vymyje a získáme barevné zóny na bezbarvém pozadí.

Až 50× citlivější vizualizace je metoda založená na vyredukování stříbra z amoniakálního roztoku na místech gelu, kde jsou fixovány bílkoviny. Jednou z dalších možností detekce je reakce fluoreskující molekuly (např. fluoreskamin), která po reakci s primárními aminy poskytuje produkt s intenzivní fluorescencí v UV-světle.

Další metodou může být autoradiografické obrazy (vznikající zářením radionuklidů), nebo pomocí enzymatických reakcí [83].

2.7.4 Chromatografické metody

Chromatografické metody můžeme rozdělit dle skupenství mobilní fáze na: plynovou, kapalinovou nebo superfluidní chromatografii. Chromatografie jako taková je separační proces založený na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze, mobilní a stacionární.

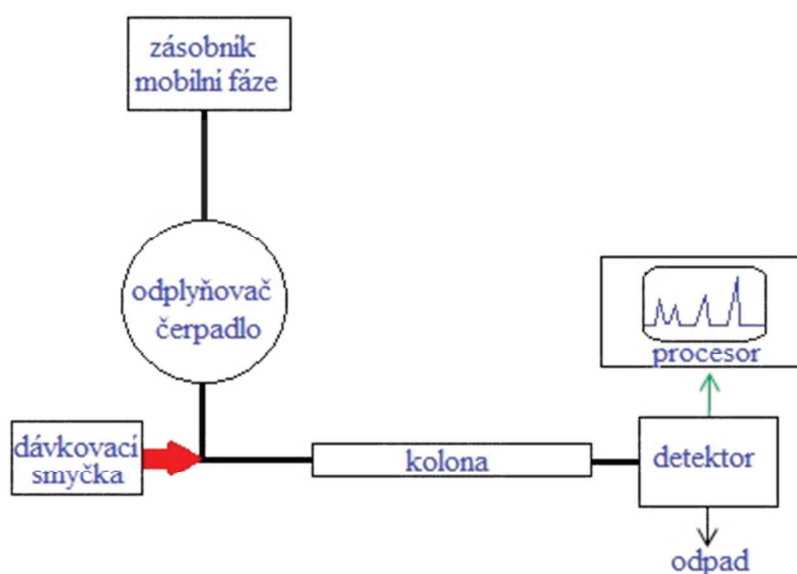
Mobilní fází v kapalinové chromatografii je kapalina. Na rozdíl od plynové chromatografie rozhoduje o separaci analytu nejen jeho interakce se stacionární fází, ale velmi výrazně

i použitá mobilní fáze. Doba, kterou stráví analyt ve stacionární nebo v mobilní fázi, závisí na afinitě ke každé z nich [81].

2.7.4.1 HPLC

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie je pokročilou a instrumentálně náročnou technikou. V HPLC je dosahováno vysoké účinnosti separačního procesu [80]. Zahrnuje soubor metod, založených na různém separačním mechanismu např. adsorpce, iontová výměna nebo molekulově síťový efekt.

Využívá se kapalná mobilní fáze, vysokotlaká technika a účinné kolony pro rychlou analýzu. Tyto metody se dají dále dělit na chromatografii v systému kapalina-kapalina (v dnešní době se tento model využívá pouze omezeně), nebo na chromatografii v systému kapalina-tuhá fáze [79].



Obr. 9: Základní schéma kapalinového chromatografu [89].

Instrumentace HPLC

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovače (který odstraňuje plyny z mobilní fáze), dále následuje čerpadlo, injektor (dávkovací zařízení), separační kolona a detektor (Obr. 9) [90]. Kapalina se čerpá za pomoci pístových nebo membránových čerpadel. Čerpadlo musí být schopno plynule dávkovat kapalinu bez kolísání (pulsů) průtoku do tlaků 30 až 50MPa, a to i při průtocích od 0,1 do 10 ml/min. Vnitřní objem čerpadla by měl být co nejmenší, aby byla umožněná rychlá výměna mobilní fáze [79, 81].

Po čerpadle následuje dávkovací zařízení. U HPLC musí být nastříknut přesně definovaný objem vzorku do proudu mobilní fáze protlačované kolonou pod velkým tlakem. K dávkování se využívá dávkovací ventil běžněji však autosampler [80]. Automatické dávkování umožňuje automaticky dávkovat řadu vzorků po sobě bez zásahu obsluhy přístroje [79, 91].

Volba vhodné kolony má u HPLC rozhodující význam. Kolony se u HPLC používají prakticky pouze náplňové. Pro většinu analýz se využívají kolony z nerezové oceli, většinou o délce 10, 15 nebo 25 cm, s vnitřním průměrem 1–2 mm, 4,6 mm nebo 5 mm. Běžný průtok

eluentu je zhruba 1–2 ml/min. Uvnitř kolony může být například silikagel, oxidy kovů (např. Al_2O_3), organické polymery nebo monolity.

Jednou z nejdůležitějších součástí chromatografu je detektor. HPLC detektory by měly být selektivní pro analyty a málo citlivé na mobilní fázi [81]. Detektory představují zařízení reagující na změny složení protékající mobilní fáze, které převádí na měřitelný signál. V dnešní době jsou téměř všechny typy používaných detektorů u HPLC koncentrační a lze je rozdělit do dvou skupin na:

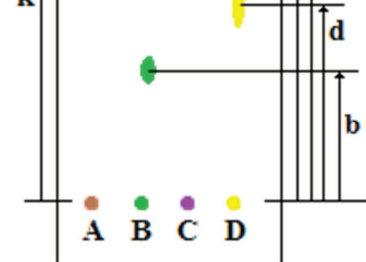
- selektivní: signál je úměrný pouze koncentraci detekované složky v eluentu
- univerzální: signál je úměrný celkové vlastnosti eluentu jako celku (mobilní fázi a detekované komponenty).

V praxi se nejčastěji využívají tyto typy detektorů: UV-VIS, fluorescenční detektor, elektrochemický detektor, refraktometrický detektor, vodivostní detektor [91]. HPLC lze spojit i s hmotnostní chromatografií [92].

2.7.4.2 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

Jde o separační metodu, kde se roztoky stanovovaných látek nanášejí na TLC destičku před vyvíjením. U TLC je stacionární fáze umístěna na pevném podkladu (například na hliníkové folii nebo skleněné desce) [81].

Separace je poté založena na adsorpci, rozdělení, iontové výměně nebo na kombinaci těchto mechanismů. K dělení dochází migrací rozpuštěných látek v rozpouštědle nebo vhodné směsi rozpouštědel (mobilní fáze) tenkou vrstvou (stacionární fáze) [93]. Stacionární fázi většinou bývá silikagel nebo alumina. Vrstva adsorbentu se pohybuje v rozmezí 0,8–0,25 mm. Proces separace je dokončen, když se rozpouštědlo blíží k vrcholu stacionární fáze. Poté se destička vyjme z mobilní fáze a osuší se.



Detekce může být vizuální, fyzikální (UV), instrumentální nebo chemická (při které se destička posprejuje vhodným činidlem) [94].

Kvalitativní vyhodnocení probíhá pomocí retardačního (retenčního) faktoru, což je podíl vzdálenosti středu skvrny od startu a vzdálenosti čela od startu. Značí se R_f (Obr. 10);

Obr. 10: TLC destička po vyvíjení vzorků, znázornění měření vzdálenosti skvrn pro výpočet retenčních faktorů.

$$R_f = \frac{\text{vzdálenost skvrny od startu}}{\text{vzdálenost čela od startu}}.$$

Za daných podmínek je v systému retardační faktor pro určitou látku konstantou. R_f známé složky určíme ze standardu a podle získané hodnoty ji vyhledáme v analyzovaném vzorku [81].

Ukázka retenčních faktorů pro chromatogram na Obr. 10:

$$R_f(A) = \frac{a}{k}$$

$$R_f(C) = \frac{c}{k}$$

$$R_f(B) = \frac{b}{k}$$

$$R_f(D) = \frac{d}{k}$$

Možnost kvantitativní analýzy je u TLC značně omezená. Koncentraci složek můžeme odhadnout na základě porovnání intenzit zbarvení skvrn komponent vzorku a standardů nadávkovaných ve známé koncentraci. Další možností je odškrabání sorbentu se skvrnou, vyextrahování analyzované látky do vhodného rozpouštědla a následné stanovení koncentrace vhodnou analytickou metodou [80].

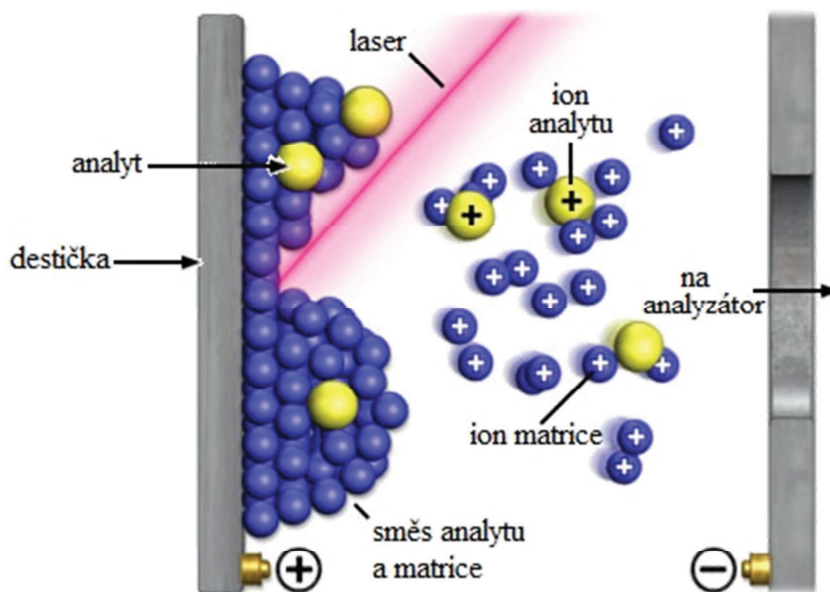
2.7.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je založena na interakci iontů a polí (magnetického a elektrického). MS lze zařadit mezi separační metody, protože majoritním procesem je zde separace na základě poměru hmotnosti a neseného náboje (m/z). Všechny hmotnostní spektrometry obsahují iontový zdroj, analyzátor a detektor [79].

Iontový zdroj se využívá k převedení neutrálních molekul analytu na nabitě částice (tzv. ionizace). Existuje velké množství různých technik ionizace. Pro kapalně vzorky se využívají různé elektrospreje nebo chemické ionizace. U pevných vzorků se využívá ionizace laserem.

Analyzátor u MS dělí ionty podle poměru hmotnosti a neseného náboje (m/z). Jako analyzátor se využívá například kvadrupólový analyzátor, iontová past, průletový analyzátor (TOF) a laserová desorpční ionizace na nosiči (MALDI, Matrix Assisted Laser Desorption Ionization). Nejčastěji se však v dnešní době setkáváme s analyzátozem MALDI-TOF [95].

U MALDI je analyt smíchaný s nadbytkem matrice. Tato směs je nanášena na destičku a je ozařována krátkými pulsy laseru. Energie laserového pulsu je absorbována především matricí, čímž dochází k její desorpci (Obr. 11). Odpařující se částice s sebou strhávají molekuly analytu a převádějí je do plynného skupenství. Analyt je matricí chráněn před rozpadem, matrice také napomáhá odpaření a ionizaci vzorku [96].



Obr. 11: Schéma ionizace analytu a matrice laserem, následná detekce vzniklých iontů pomocí MS [97].

Poslední částí hmotnostního spektrometru je detektor. Tím může být například elektronásobič nebo fotonásobič.

Hmotnostní spektrometrie je nejpřesnější metodou pro identifikaci a charakterizaci stanovovaných látek. Většinou se spojuje jako GC/MS nebo HPLC/MS popřípadě CE/MS [81].

2.7.6 Papírová metoda

Dot-blot papírová metoda popsána Fryem (1997) je uvedena v kap. 2.6.4 [70]. Po provedení uvedeného postupu se papírová matrice vyhodnotí kvantitativně. Například měřením na přístroji The SynergyTMHT (Biotek), který měří absorbanci, fluorescenci nebo luminiscenci.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Přístroje a zařízení

- Mini-PROTEAN® Tetra Cell, *Bio-Rad*, USA
- Synergy HT multi-mode microplate reader, *Biotek*, USA
- UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF (FlexControl, FlexAnalysis), *Bruker Daltonics*, Německo
- AnchorChip TF 384, *Bruker Daltonics*, Německo
- Protean® I12™ IEF system, *Bio-Rad*, USA
- Vakuová rotační odparka typ 351, *Unipan*, Polsko
- Centrifuga Allegra X-22R Series, *Beckman coulter*, USA
- Laboratorní mini-centriguga Chibitan II, *Merck Millipore*, Tokio
- Vortex mixer VM-300, *Gemmy industrial corp.*, Taiwan
- Míchačka rocking platform typ WT 15, *Biometra*, Německo
- Spektrofotometr UV/VIS 6305, *Jenway*, Anglie
- Agilent 1100 HPLC, *Hewlett Packard*, USA
- InoLab pH Level 1, *WTW*, Německo
- MS-3000 Magnetic stirrer, *Biosan*, Lotyšsko
- MiniSpin s rotorem F-45-12-11, *eppendorf*, Německo
- Lyofilizátor: FreeZone® 6, 12 and 18 Liter, *Labconco corporation*, USA
- Namrazování u lyofilizátoru: Freezone benchtop shell freezer, *Labconco corporation*, USA
- SpeedVac Concentrator Savant SVC100H, *Thermo Scientific*, USA

3.2 Pomůcky

- TLC destičky Silica gel 60 F₂₅₄, 20×20cm, *Merck*, Německo
- Silikagel 60, *Merck*, Německo
- EP 200-Agroperlit (1 x 4 mm), *LB Minerals, a.s.*, Slovenská republika
- Papírová matrice Whatman 3MM, *Sigma-Aldrich*, USA
- Silonová plachetka
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky

3.3 Chemikálie

- Sulforodamin (Lissamine™ rhodamine B sulfonyl chloride, LRSC) – Across Organics, *Thermo Scientific*, USA
- Ethanol, *Merck Millipore*, Německo
- Acetonitril, *Merck Millipore*, Německo
- Metanol, *Merck Millipore*, Německo
- Aceton, *Slavus*, Slovenská republika
- Butanol, *Merck Millipore*, Německo
- Kyanoborohydrid sodný, *Merck Millipore*, Německo
- Octan amonný, *Lachema*, Česká republika
- Orcinol, *Lachema*, Česká republika

- Nesslerovo činidlo, *Merck Millipore*, Německo
- Izopropanol, *Sigma-Aldrich*, USA
- Kyselina mravenčí, *Penta*, Česká republika
- 2,5-dihydroxybenzoová kyselina, *Sigma-Aldrich*, USA
- α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina, *Sigma-Aldrich*, USA
- Chlorid sodný, *Merck Millipore*, Německo
- Síran amonný, *Slavus*, Slovenská republika
- Peroxodisíran amonný (APS), *Lachema*, Česká republika
- Dodecylsíran sodný (SDS), *Serva*, USA
- 2-amino-2-hydroxymetyl-propan-1,3-diol (Tris), *Sigma-Aldrich*, USA
- Akrylamid, *Sigma-Aldrich*, USA
- Bis-akrylamid, *Sigma-Aldrich*, USA
- N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin (Temed), *Sigma-Aldrich*, USA
- Glycin, *Lachema*, Česká republika
- Coomassie Brilliant Blue, *Thermo Scientific*, USA
- Standard pro elektroforézu (PageRuler Prestained Protein Ladder, 10 až 170 kDa), *Thermo Scientific*, USA
- Kyselina octová, *Slavus*, Slovenská republika
- Trichloroctová kyselina (TCA), *Sigma-Aldrich*, USA
- Tetraboritan sodný, *Lachema*, Česká republika
- Rehydratační roztok pro IEF (ReadyPrep™ 2-D Starter Kit), *Bio-Rad*, USA
- Minerální olej pro IEF, *Bio-Rad*, USA
- Standard pro IEF (Protein test mixture for pI-determination, pH 3-10), *Serva*, Německo
- Agaróza, *Sigma-Aldrich*, USA
- Kyselina citrónová, *Slavus*, Slovenská republika
- Fosforečnan sodný, *Lachema*, Česká republika
- Voda

3.4 Příprava fluorescenčně značených substrátů

Polymery sacharidů pocházely z různých rostlinných zdrojů, které se zakoupily v komerčních firmách. Oligosacharidy z příslušných polymerů připravil p. Lipka na Chemickém ústavě, Slovenská akademie věd, Bratislava, Slovenská republika.

Připravené oligosacharidy:

- XGOS
- LAOS
- PUOS
- CEOS
- GMOS
- manooligosacharidy (MANOS)
- arabinogalaktoligosacharidy (AGOS)
- MLGOS
- OUA

- XYLOS

Tyto oligosacharidy se fluorescenčně značily SR podle níže uvedeného postupu.

Aminace

Navázila se reakční směs:

- 5 mg oligosacharidu
- 5 mg kyanoborohydridu sodného
- 30 mg octanu amonného
- 100 µl vody.

Připravená směs se nechala inkubovat v uzavřené eppendorfcce čtyři hodiny při 80 °C. Po skončení inkubace se odebraly 2 µl do 18 µl vody. Z toho se nanesl 1 µl na silikagelovou destičku. Tato destička se nechala vyvíjet v systému n-propanol-methanol-voda (2/1/1). Po vyvinutí se destička vytáhla, osušila pod fénem a následovala detekce roztokem orcinolu. Kdy glykaminy zůstávaly na startu.

K reakční směsi se přidaly 3 ml ethanolu a směs se nechala stát 10–15 min v mrazáku. Vzniklá sraženina se následně promyla 90% ethanolem a zcentrifugovala (4 °C, 4500 ot/min). Po odstředění se vyzkoušela reakce na amonné ionty v supernatantu pomocí Nesslerova činidla. Pokud byla reakce pozitivní opět se sraženina promyla 90% ethanolem a postup se opakoval. Takto se sraženina promývala až do negativní reakce s Nesslerovým činidlem.

Barvení

Promytá sraženina z předchozího kroku se rozpustila v 0,5 ml 3% tetraboritanu sodném. Následně se přidalo 5 mg SR. V uzavřené zkumavce se roztok nechal inkubovat 6–16 hod. při pokojové teplotě.

Poté se roztok vysrážel pomocí 5 ml acetonu. Takto se sraženina promývala acetonem dokud nebyl supernatant bezbarvý.

Produkty se vymyly ze sraženiny 70% ethanolem, 3–4 krát, po každém promytí a zcentrifugování se supernatant odložil. Nakonec se supernatanty spojily a poté se zkontrolovaly pomocí TLC (ve vyvíjecím systému butanol-ethanol-voda (5/3/2)). TLC destičky se vyhodnotily pod UV světlem. Jako standard se použil samotný SR.

Spojené ethanolové supernatanty se zahustily do sucha na vakuové rotační odparce. Odparek se rozpustil v 1–2 ml 20% ethanolu.

Koncentrace se stanovila spektrofotometricky (10 µl vzorku a 990 µl ethanolu), při vlnové délce 566 nm, oproti 20% ethanolu, který se využíval jako kontrolní vzorek.

Přečištění produktu

Do prázdné 5 ml plastové injekční stříkačky, která se na spodku vystlala skleněným filtračním papírem, nebo vatou, se nasypalo přibližně 5 ml silikagelu 60. Silikagel se v kolonce dobře utřesl a na něj se nanesl rozpuštěný produkt. Kolonka se vymývala nejprve acetonem. Po vymytí barvy se na kolonku nanesl 20% ethanol, kterým se vytěsnil vzorek. Získaný produkt se zahustil na vakuové rotační odparce. Kontrola čistoty vzorku se provedla pomocí TLC, v systému butanol-ethanol-voda (5/3/2), kdy detekce probíhala pod UV světlem.

Tímto postupem byly nabrveny následující oligosacharidy:

- XGOS-SR
- LAOS-SR
- CEOS-SR
- AGOS značené SR (AGOS-SR)
- GMOS značené SR (GMOS-SR)
- MANOS značené SR (MANOS-SR)
- PUOS značené SR (PUOS-SR)
- MLGOS značené SR (MLGOS-SR)
- OUA značené SR (OUA-SR)
- XYLOS značené SR (XYLOS-SR)

3.4.1 Kontrola pomocí TLC

Vzorky se po proběhnutí reakce opět zkontrolovaly pomocí TLC, ve vyvíjecím systému butanol-ethanol-voda (5/3/2), s detekcí pod UV světlem. Jako standard se použil samotný SR.

3.4.2 Kontrola čistoty fluorescenčně značených substrátů pomocí MS

Molekulové hmotnosti použitých fluorescenčně značených oligosacharidů se analyzovaly pomocí hmotnostní spektrometrie na UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF hmotnostním spektrometru. Kdy 0,5 µl značeného oligosacharidu (50 ng/µl vody) se smíchalo s 0,5 µl matrice na ocelové destičce s terčíky sloužícími pro aplikaci vzorku. Jako matrice se použila 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (10 mg/ml) nebo α -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina v 60% (w/v) acetonitrilu. Systém se kalibroval měřením šesti standardních peptidů, měření se uskutečnilo v pozitivním iontovém módu při reflektroновém uspořádání v programu FlexControl. Naměřená data se vyhodnotila v programu FlexAnalysis.

3.5 Izolace proteinového extraktu ze semen lichořeřišnice a petržele

Na vlhčený perlit se nasadila semena Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) nebo petržele Olomoucké dlouhé (*Petroselinum crispum*). Po sedmi dnech klíčení, se oddělila naklíčená semena od ostatních částí rostlin.

Tato semena se roztřela v třecí misce spolu s citrát-fosfátovým pufrém, pH 5,5 s obsahem 1M NaCl. Semena se třela do vzniku kašičky. Poté se tento roztok nechal míchat na míchačce v chladicím boxu přes noc. Další den se směs přefiltrovala přes silonovou plachetku, aby se odstranily hrubé nečistoty.

Získaný roztok se zcentrifugoval (20 min, 20 000 ot/min při 4 °C). Po centrifugaci se odebral supernatant tak, aby nedošlo k nasátí usazené látky. Následovalo frakční srážení síranem amonným, do dosáhnutí 90 % saturace (61,1 g síranu amonného na 100 ml supernatantu). Síran se k roztoku přidával pomalu, v chladicím boxu za stálého míchání. Po přidání veškerého síranu se roztok míchal v chladu ještě další hodinu.

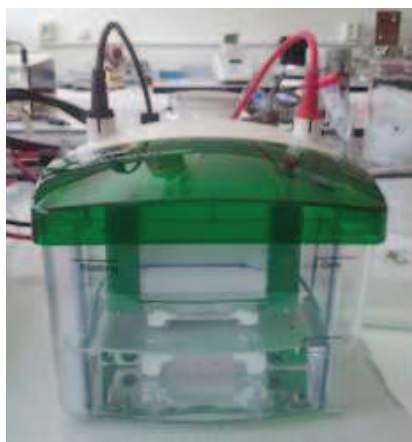
Následně se roztok opět cetrifugoval (15 min, 20 000 ot/min při 4 °C). Odebral se supernatant a sediment se rozmíchal v destilované vodě. Tento roztok se dal do dialyzačního střívka na dialýzu. Vzorek se dialyzoval dvě hodiny pod tekoucí vodou. Nakonec probíhala dialýza v destilované vodě (zhruba jednu hodinu) a následně

v redestilované vodě za současného míchání v chladu přes noc. Zdialyzovaný roztok se na závěr zlyofilizoval. Lyofilizát se poté přechovával v eppendorfkách v mrazáku.

3.6 Elektroforéza

Na elektroforézu se použila aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Obr. 12). Mezi skla se nalil separační gel (Tab. 2). Nad tímto separačním gelem se ponechal volný prostor asi 1,5 cm. Separační gel se poté překryl 96% ethanolem nebo izopropanolem. Po ztuhnutí separačního gelu se ethanol důkladně vymyl vodou. Na ztuhlý gel se nanese koncentrační gel (Tab. 3). Do tohoto koncentračního gelu se vložil hřeben a gel se nechal ztuhnout.

Po ztuhnutí se gel (složený ze separačního a koncentračního gelu) vložil do aparatury pro elektroforézu, do které se nalil roztok, ve kterém běží elektroforéza (running pufr).



Obr. 12: Aparatura Mini-PROTEAN® Tetra Cell.

Tab. 2: Složení separačního gelu:

% koncentrace gelu	7%	10%	12%	15%
chemikálie	množství na 1 gel [ml]			
voda	2,55	2,05	1,70	1,20
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 s 0,4% SDS	1,25	1,25	1,25	1,25
akrylamid:bis-akrylamid (30%:0,8% w/v)	1,15	1,65	2,00	2,50
10% (w/v) APS	0,025	0,025	0,025	0,025
temed	0,002 5	0,002 5	0,002 5	0,002 5
celkový objem	5,002 5	5,002 5	5,002 5	5,002 5

Tab. 3: Složení koncentračního gelu:

chemikálie	množství na 1 gel [ml]
voda	1,540
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 s 0,4% SDS	0,625
akrylamid:bis-akrylamid (30%:0,8% w/v)	0,335
10% (w/v) APS	12,500
temed	2,500
celkový objem	2,525

Složení running pufru, pH 8,3 (na 1 litr):

- 0,125 M 15 g Tris Base
- 0,960 M 72 g glycín
- 0,5% 5 g SDS

Navážené množství chemikálií se doplnilo do 500 ml vodou, upravilo se pH a roztok se dolpnil do 1 000 ml. Takto získaný running pufr se musí vždy před nalitím do aparatury 5× zředit. Po nalití pufru, ve kterém běží elektroforéza, se z gelu vytáhl hřeben a do vymezených prostorů se nadávkoval standard a vzorky. Elektroforéza se zapojila a při 200 V běžela přibližně hodinu.

Následně se pokračovalo barvením gelu pomocí Coomassie Brilliant Blue (CBB). K tomuto barvení je potřeba: fixační roztok, barvicí roztok a odbarvovací roztok.

Po skončení elektroforézy se gel ponořil do 100 ml fixačního roztoku a nechal se míchat na míchačce jednu hodinu. Po vylití tohoto roztoku z Petriho misky se gel barvil zhruba ve 100 ml barvicího roztoku.

Barvicí roztok se z Petriho misky vylil a gel se opláchnul destilovanou vodou. Do Petriho misky s gelem se poté nalilo zhruba 100 ml odbarvovacího roztoku a gel se nechal odbarvovat 24 hod. V případě potřeby se odbarvovací roztok v průběhu odbarvování vyměňoval.

Složení fixačního roztoku (na 1 litr):

- methanol 454 ml
- voda 500 ml
- kyselina octová 46 ml

Složení barvicího roztoku (na 1 litr):

- methanol 454 ml
- voda 500 ml
- kyselina octová 46 ml
- CBB 1 g

Roztok je třeba před použitím zfiltrovat.

Složení odbarvovacího roztoku (na 1 litr):

- methanol 50 ml
- voda 875 ml
- kyselina octová 75 ml

3.7 Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace se prováděla na přístroji Protean® I12™ IEF systém s kitem ReadyPrep™ 2-D Starter Kit. Použily se 7 cm gelové proužky (stripy) s rozsahem pH 3–10.

Do rehydratační nádoby se napipetoval roztok složený z:

- vzorek 25 µl
- voda 25 µl
- rehydratační roztok 125 µl

Stejným způsobem se připravil a rehydratoval i vzorek standardu složený z:

- standard 25 µl
- rehydratační roztok 125 µl

Z gelových stripů se opatrně sundaly folie, stripy se vložily gelem dolů do roztoku a po hodině se zalily 2–3 ml minerálním olejem a nechaly se rehydratovat přes noc.

Poté se gelové stripy vyndaly z minerálního oleje, nechaly se zhruba osm sekund okapat. Po okapání se stripy vložily mezi elektrody gelem dolů. Nakonec se nastavil program a spustila se IEF (Tab. 4).

Tab. 4: Podmínky IEF:

200 V	30 min
700 V	120 min
700 V	20 min
300 V	30 min

Po skončení IEF se gelové stripy nabarvily pomocí CBB.

V případě barvení se proteiny fixovaly 40 min v 20% TCA. Dále následovalo hodinové barvení pomocí roztoku CBB a odbarvování s odbarvovacím roztokem (složení kap. 3.6).

3.8 Detekce transglykozylačních aktivit

Detekce transglykozylačních aktivit proteinových extraktů, ze semen lichořeřišnice a petržele, se provedla pomocí papírové metody a metody HPLC.

3.8.1 Měření aktivity pomocí papírové metody

Na papírovou matrici se nanasla reakční směs obsahující 5 µl sacharidového polymeru, 1 µl fluorescenčně značeného oligosacharidu a 5 µl proteinového extraktu z klíčících semen lichořeřišnice nebo petržele. Stanovení se provádělo v pěti časových intervalech (0; 0,5; 2; 5 a 24 hod).

Na detekci transglykozylačních aktivit se použily jako akceptory reakce všechny připravené fluorescenčně značené oligosacharidy a jako donor reakce se použil 0,3% XG. Lyofilizáty získaných proteinových extraktů se rozpustily ve vodě a zcentrifugovaly se.

Do nových označených eppendorfek se napipetovalo 11 µl kyseliny mravenčí. Po zadaných časových intervalech se odebíralo 11 µl reakční směsi do eppendorfek s kyselinou mravenčí, která zastavuje příslušnou enzymovou reakci.

Poté se z eppendorfek nanášely paralelně na připravenou papírovou matrici 4 µl reakční směsi. Matrice se vyrobila z filtračního papíru Whatman 3MM a odpovídala 96 jamkové mikrotitrační destičce.

Po nanesení a zaschnutí vzorků se matrice vymývala s vymývacím roztokem v Petriho misce přibližně dvě hodiny. Po tomto čase se matrice vymývala další hodinu v roztoku 66% ethanolu.

Složení vymývacího roztoku (na 1 litr):

- kyselina mravenčí 50 ml
- voda 290 ml
- ethanol 660 ml

Po vymytí se matrice vysušila fénem a vznik fluorescenčně značeného hybridního produktu se detekoval pomocí přístroje Synergy HT multi-mode microplate reader nebo pod UV světlem.

3.8.2 HPLC

Reakční směsi se připravily stejným postupem jako v kap. 3.8.1 a inkubovaly se v různých časových intervalech. Jako kontrola se použila reakční směs, která se nanasla na kolonu v čase 0 hod., nebo se použil samotný značený oligosacharid.

Analýzy se uskutečnily v izokratickém režimu, na principu molekulárního síta (size-exclusion chromatography), na přístroji Hewlett Packard 1100 (Palo Alto, CA, USA) s fluorescenčním detektorem. Jako software se využil program ChemStation (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Detektor se naprogramoval tak, že při 530 nm docházelo k excitaci a k emisi docházelo při 575 nm. K analýze se využila kolona TSK gel G3000 SWXL o rozměrech 7,8×300 mm (TosoHaas, Tokio, Japan). Jako mobilní fáze se použil 100 mM octan amonný s pH 5,7, který obsahoval vodný acetonitril. Rychlost eluce se nastavila na 0,5 ml/ml [98].

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

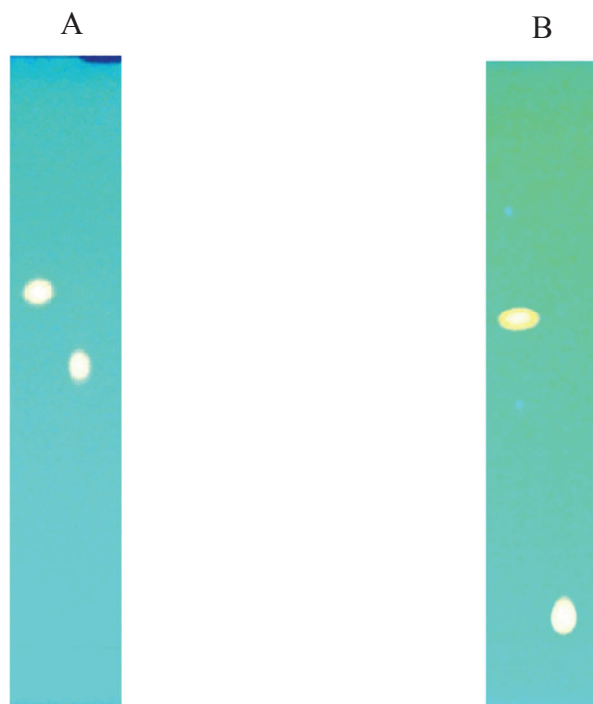
4.1 Identifikace značených oligosacharidů pomocí TLC

Kontrola složení a kvality fluorescenčně značených oligosacharidů byla prováděna pomocí TLC s detekcí pod UV světlem podle kap. 3.4.1.

Na Obr. 13 jsou zobrazené silikagelové destičky, na které byly nanесeny roztoky připravených oligosacharidů XGOS-SR a GMOS-SR. Ty byly v použité mobilní fázi rozděleny na základě svých rozdílných afinit ke stacionární fázi, resp. molekulových hmotností oligosacharidů přítomných ve vzorcích. Jako kontrola byl použit vodný roztok SR.

Na Obr. 13A,B byl SR detekován nahoře TLC destiček, jelikož šlo o látku s nižší molekulovou hmotností. Naproti tomu značené XGOS-SR byly nalezeny na spod TLC destičky, protože představovaly směs oligosacharidů s větší molekulovou hmotností, xyloglukannonasacharidy značené SR (XGOS9-SR) (Obr. 13B).

Na druhé silikagelové destičce (Obr. 13A) byly nalezeny vedle čistého SR galaktomanodisacharidy značené SR (GMOS2-SR). Jelikož šlo o menší molekulu, byla těsně pod SR.



Obr. 13: TLC fluorescenčně značených oligosacharidů, A–GMOS-SR, B–XGOS-SR.

4.2 Identifikace značených oligosacharidů pomocí MALDI-TOF MS

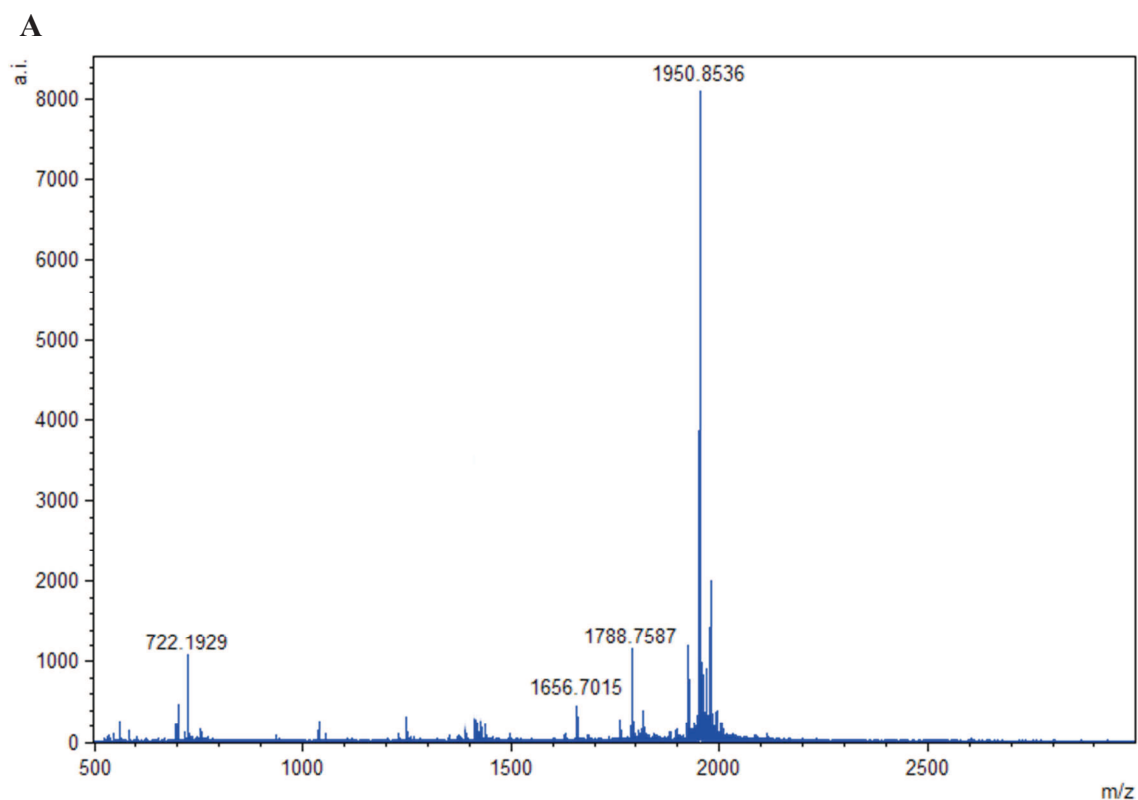
Připravené oligosacharidy byly následně analyzovány pomocí MS, podle kap. 3.4.2. Protože jde o citlivější metodu, na získaných spektrech mohly být ověřeny výsledky získané z TLC. Jelikož analýzy byly provedeny v pozitivním reflektrotonovém módu, docházelo k vazbě kationtu Na^+ na příslušné oligosacharidy.

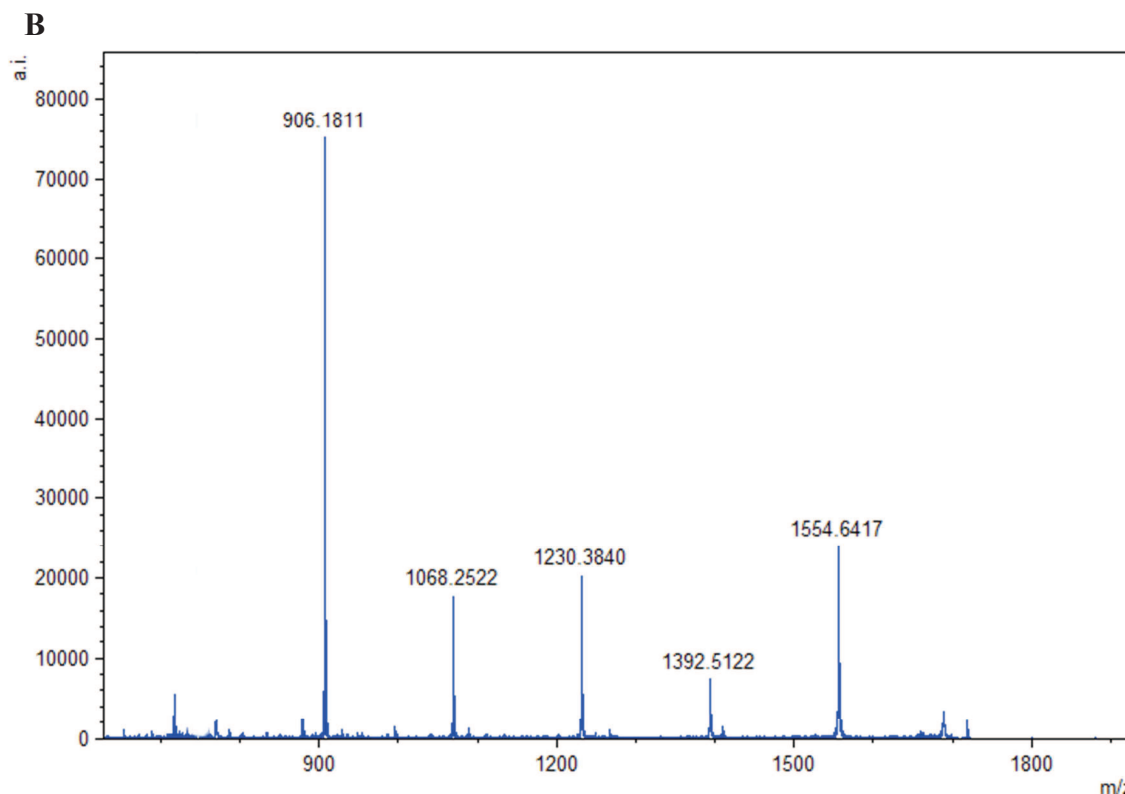
Ze získaného spektra (Obr 14A) pro XGOS-SR bylo možné vyčíst, že nejvyšší intenzitu vykazoval pík s molekulovou hmotností 1 950 g/mol, který představoval nonasacharidy. Ty byly identifikovány i pomocí metody TLC. Ve vzorku byly též přítomné oktasacharidy

a heptasacharidy s molekulovými hmotnostmi 1 788 g/mol a 1 656 g/mol. Pomocí MS byly identifikovány i monosacharidy (722 g/mol), které byly ve všech analyzovaných vzorcích XGOS-SR. Pravděpodobně docházelo k jejich odštěpení při ionizaci.

Na spektru pro GMOS-SR (Obr. 14B) byl s nejvyšší intenzitou zaznamenán disacharid s molekulovou hmotností 906 g/mol. Dále byly detekovány trisacharidy (1 068 g/mol), tetrasacharidy (1 230 g/mol), pentasacharidy (1 392 g/mol) a hexasacharidy (1 554 g/mol), které nebyly pomocí metody TLC identifikovány.

Metodou MS byly potvrzeny výsledky získané pomocí TLC. XGOS-SR obsahovaly především nonasacharidy a GMOS-SR zase disacharidy. Oligosacharidy detekované pomocí TLC vykazovaly na MALDI nevyšší intenzitu.





Obr. 14: Hmotnostní spektra fluorescenčně značených oligosacharidů po jejich analýze MALDI-TOF MS. A – XGOS-SR, B – GMOS-SR.

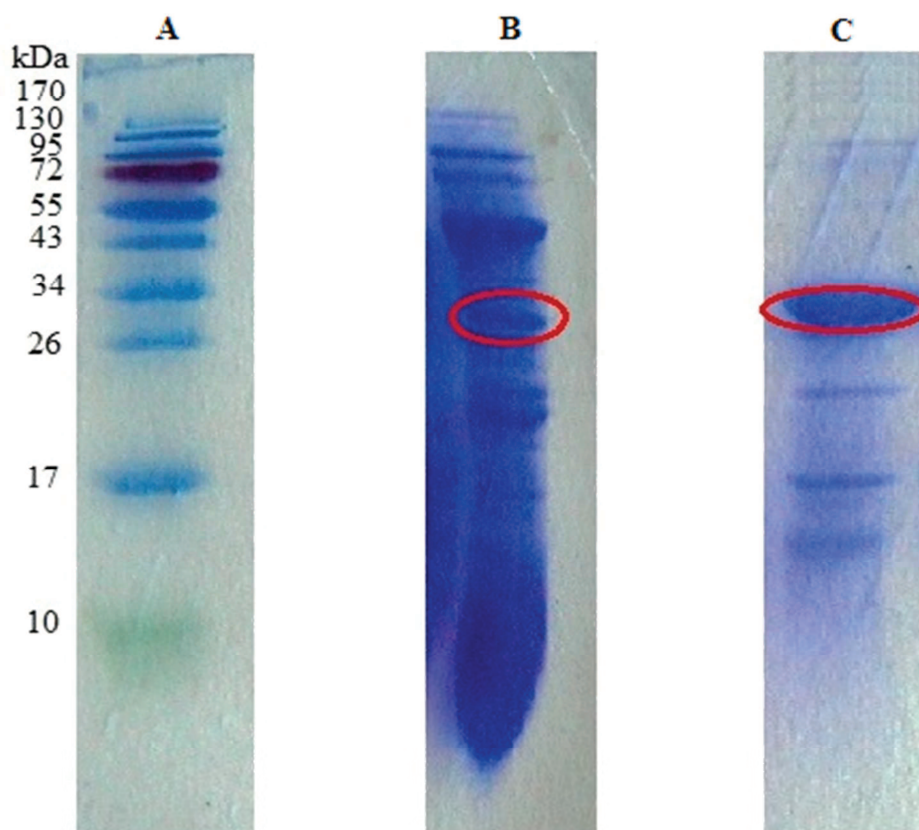
4.3 Izolace proteinového extraktu ze semen lichořeřišnice a petržele

Dle postupu uvedeného v kap. 3.5 byly vyizolovány proteinové extrakty z naklíčených semen lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) a petržele Olomoucké dlouhé (*Petroselinum crispum*). Tyto extrakty byly dále analyzovány pomocí IEF na polyakrylamidovém gelu (IEF-PAGE) a SDS-PAGE.

4.4 Elektroforéza

SDS elektroforéza byla provedena se získanými extrakty z naklíčených semen lichořeřišnice a petržele. Izolovaná XET by dle doposud publikovaných prací měla mít okolo 30 kDa. Gelové pásy obsahující vzorky po jejich rozdělení na základě molekulových hmotností byly uvedeny na Obr. 15. Jako standard byl použit PageRuler Prestained Protein Ladder, obsahující proteiny s molekulovými hmotnostmi 10 až 170 kDa.

Jelikož extrakt z petržele byl navíc přečištěný pomocí afinitní chromatografie, obsahoval méně proteinů než extrakt z lichořeřišnice. V proteinových extraktech studovaných rostlin byly nalezeny enzymy s molekulovou hmotností přibližně 30 kDa (Obr. 15). Mohlo být tedy předpokládáno, že tyto pásy představovaly hledaný enzym XET.



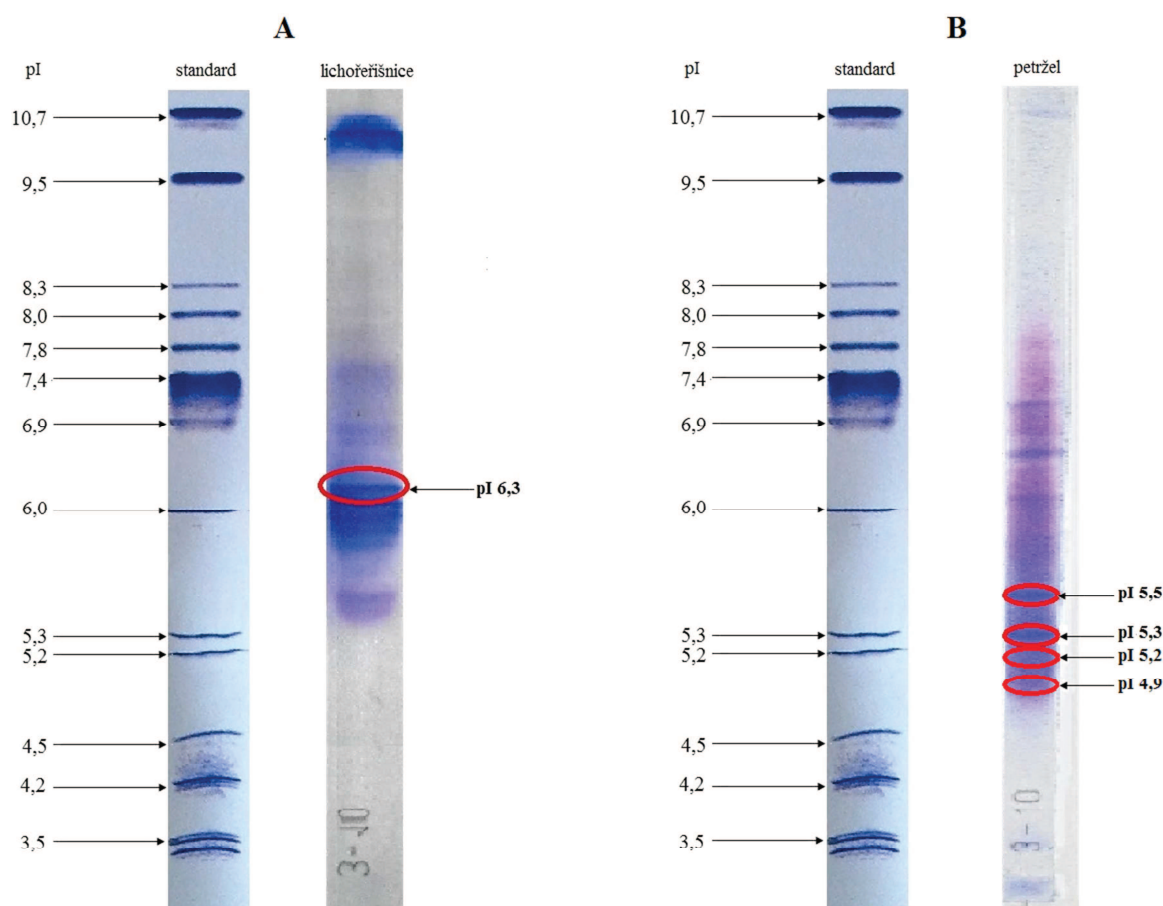
Obr. 15: Gelové pásy po SDS elektroforéze a barvení CBB; A – standard, B – lichořeřišnice a C – petržel. Hledaný enzym je červěně zakroužkovaný.

4.5 IEF

Izoelektrická fokusace byla provedena podle kap. 3.7. Literatura uvádí, že v semenech lichořeřišnice bylo nalezeno několik majoritních a minoritních forem XET. Kdy hodnota pI majoritních forem byla určena na 5,14; 4,7; 5,5; 6,3 a 6,9 a pI minoritních forem na 4,4 a 9,6 [62, 63]. V semenech petržele byly doposud identifikované XET s pI v rozsahu od 4,55 do 5,9 [99].

V této části práce byl hledán enzym s pI 6,3 ze semen lichořeřišnice, jelikož tomuto proteinu byla připsaná heterotransglykozylační aktivita [66]. V případě semen z petržele nebyla doposud připsána žádné z izoform XET aktivita katalyzující heterotransfery.

Na Obr. 16, v proteinovém extraktu ze semen lichořeřišnice, byl zobrazen přítomný enzym s pI 6,3. V extraktu ze semen z petržele byly také nalezeny proteiny v hledaném rozsahu pI, s hodnotami 5,5; 5,3; 5,2 a 4,9. Jelikož nebylo pracováno s purifikovanými enzymy, byly ve vzorcích přítomny i další proteiny, podobně jako při SDS elektroforéze. I přesto však byly touto metodou identifikovány hledané enzymy (XET).



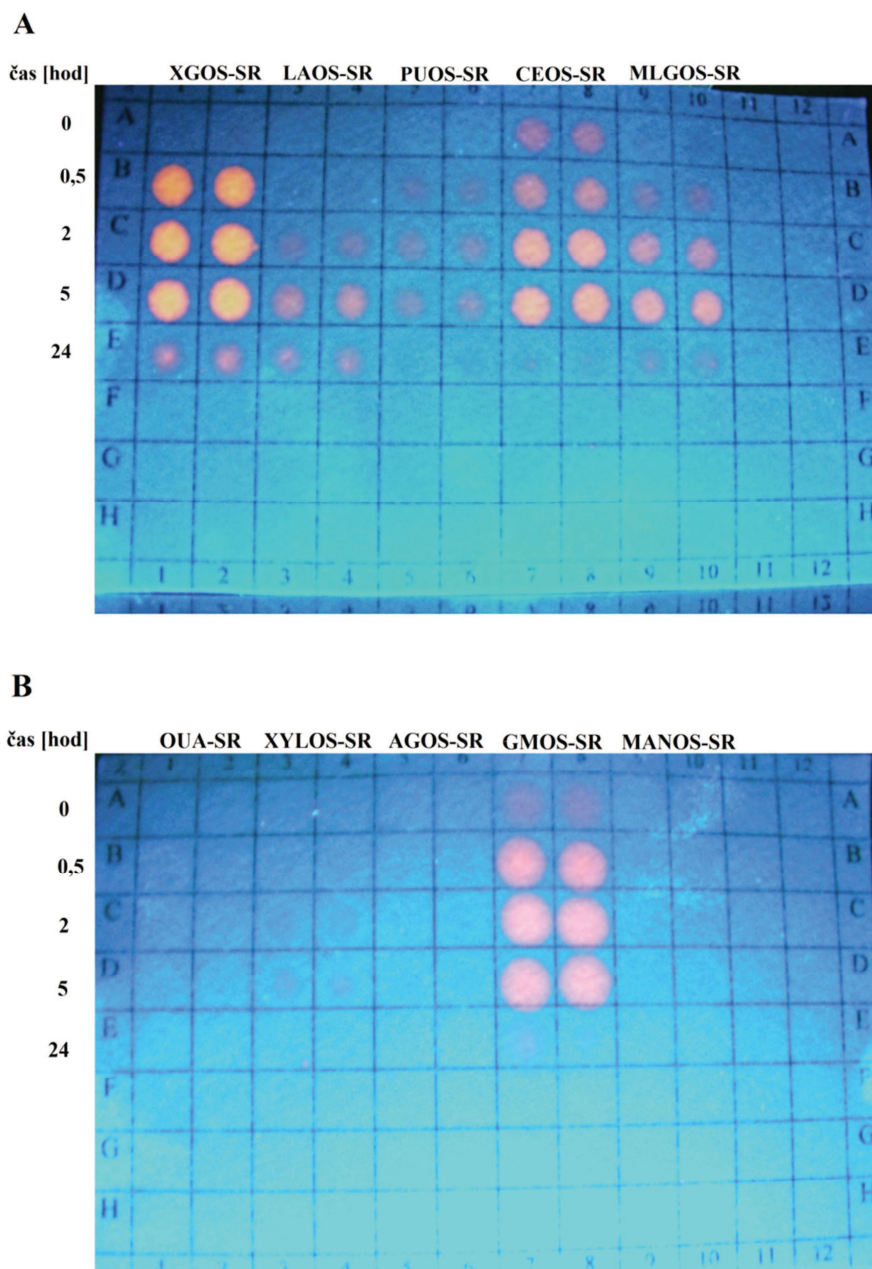
Obr. 16: Gelové pásy po IEF. A–vzorek lichoreřišnice se zvýrazněným pI s hodnotou 6,3. B–vzorek petržele se zvýrazněným pI s hodnotou 5,5; 5,3; 5,2 a 4,9 hodnoty, tyto hodnoty pI odpovídají hledaným hodnotám pI pro enzym XET.

4.6 Detekce transglykozylačních aktivit lichoreřišnice a petržele

4.6.1 Papírová metoda

Reakční směsi byly připraveny a nanoseny paralelně na papírovou matrici Whatman 3MM, přesně podle postupu uvedeném v kap. 3.8.1. Transglykozylační aktivita resp. tvorba hybridního produktu byla detekována pod UV světlem a měřením fluorescenčních jednotek na přístroji The SynergyTMMHT.

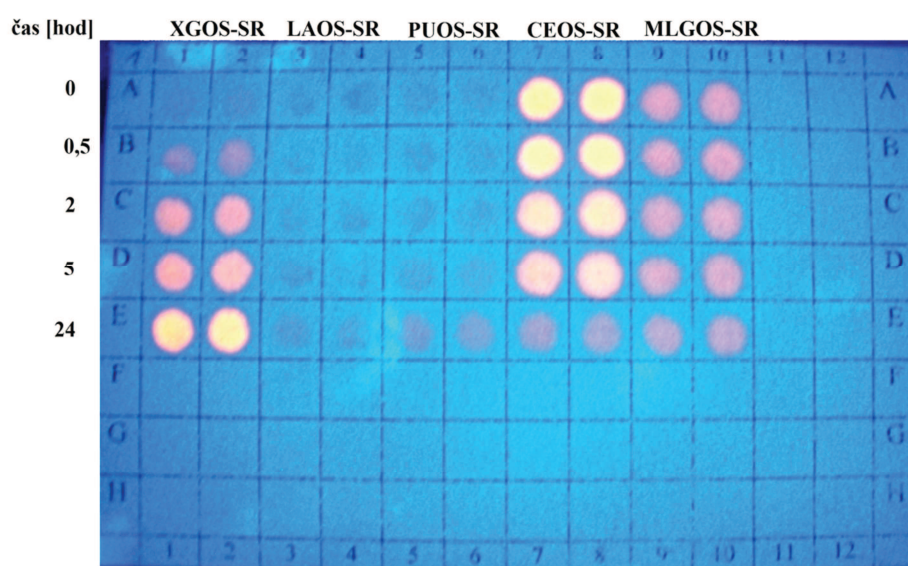
Na Obr. 17, detekce pod UV světlem, bylo pozorováno, že k nejintenzivnější tvorbě produktů, při využití proteinového extraktu z lichoreřišnice, docházelo mezi substrátovým párem XG/XGOS-SR (Obr. 17A). Tento výsledek byl očekáván, jelikož jde o přirozenou reakci v rostlinných buněčných stěnách. Vysoká fluorescence byla pozorována i pro pár XG/GMOS-SR (Obr. 17B). Vysoké hodnoty fluorescence byly též upozorovány i pro pár XG/CEOS-SR, což mohlo být způsobené stejným složením CEOS a hlavního řetězce XG. U oligosacharidů GMOS-SR a CEOS-SR docházelo k jejich absorpci, kdy tyto oligosacharidy byly pravděpodobně vázány s celulózu v papírové matrici, už v čase 0 hod. Tvorba značeného produktu byla zaznamenána i u párů XG/LAOS-SR, XG/PUOS-SR a XG/MLGOS-SR.



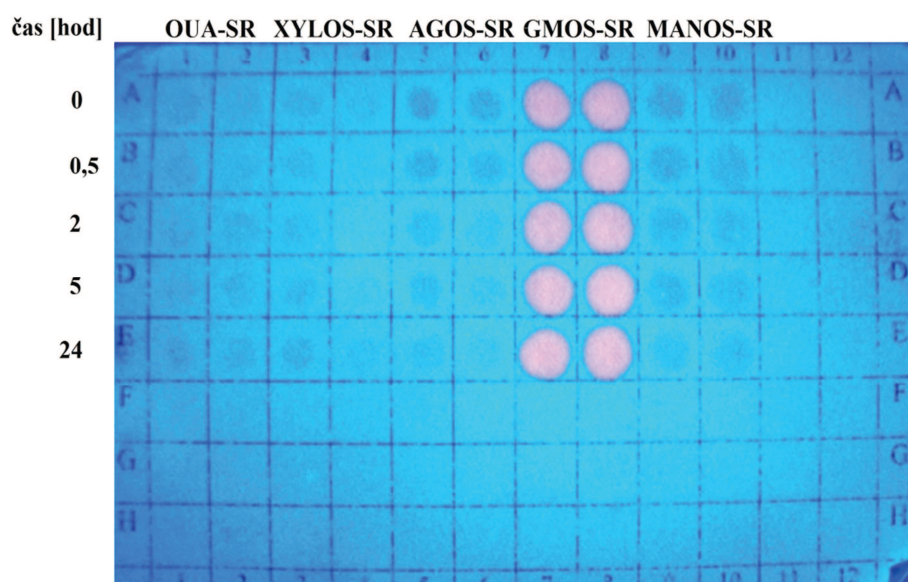
Obr. 17 A, B: Papírové matrice vizualizované pod UV světlem, na které byly naneseny reakční směsi, obsahují XG jako donorový substrát, fluorescenčně značené oligosacharidy jako akceptorové substráty a proteinový extrakt ze semen lichořeřišnice.

Stejným postupem byla provedena papírová metoda i pro proteinový extrakt z petržele. Vysoká enzymová aktivita byla opět pozorována (Obr. 18 A,B) u párů XG/XGOS-SR, XG/GMOS-SR a XG/CEOS-SR a navíc i u páru XG/MLGOS-SR. Na začátku inkubace znovu docházelo k absorpci značených akceptorových substrátů, GMOS-SR, CEOS-SR a MLGOS-SR. K tvorbě značeného produktu docházelo i v reakční směsi obsahující XG/PUOS-SR.

A



B



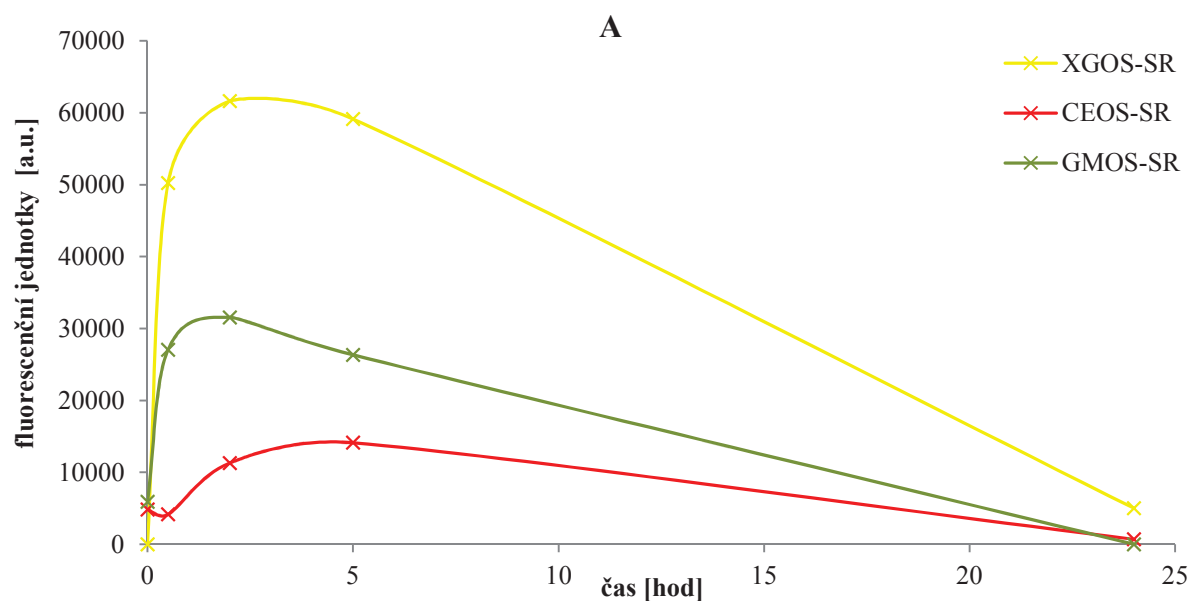
Obr. 18 A, B: Papírové matrice vizualizované pod UV světlem, na které byly nanášeny reakční směsi, obsahují XG jako donorový substrát, fluorescenčně značené oligosacharidy jako akceptorové substráty a proteinový extrakt ze semen petržele.

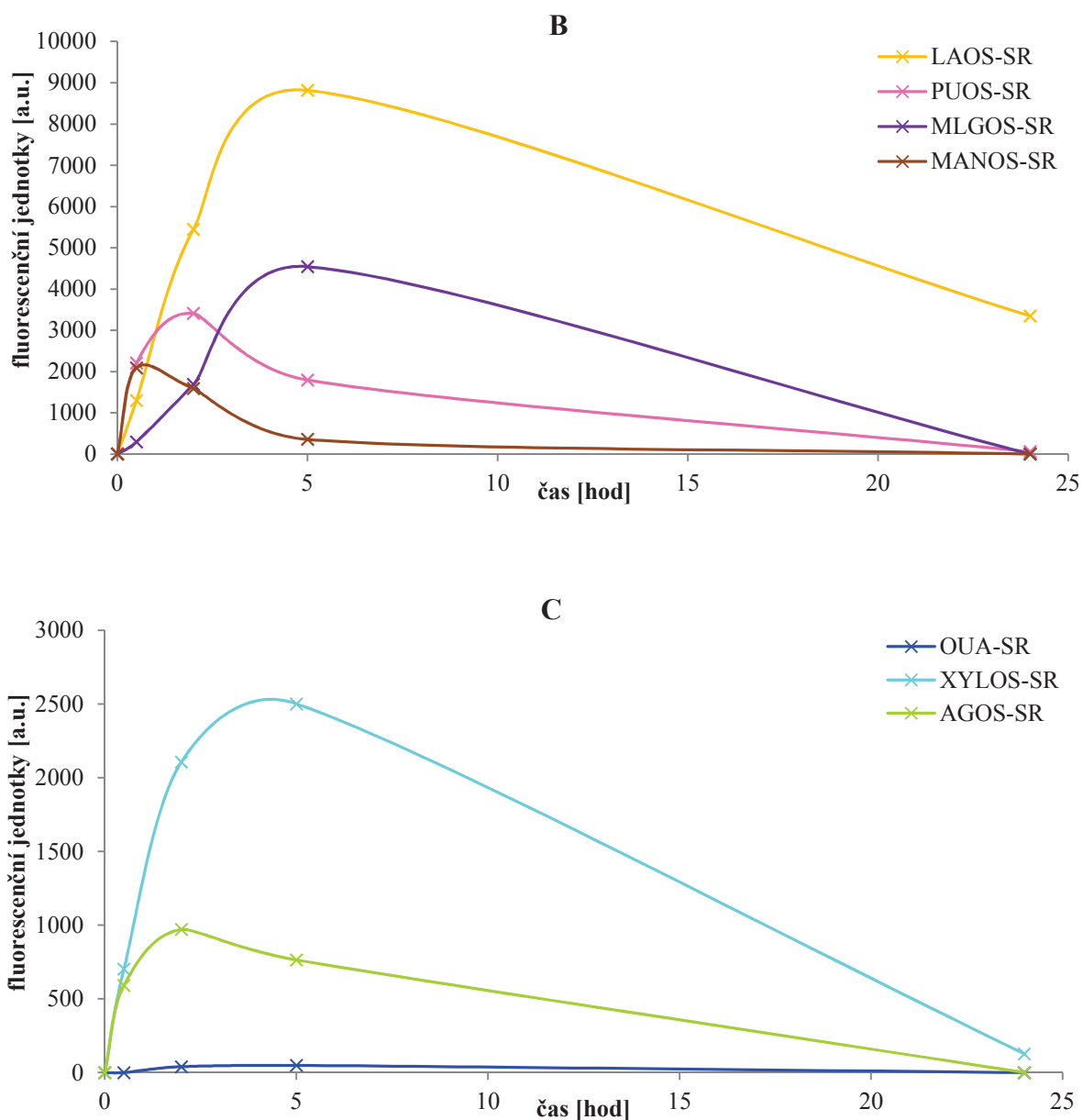
Intenzita fluorescence byla změřena pomocí přístroje Synergy HT multi-mode microplate reader. Po změření aktivity byly získaná data zpracována. Naměřené fluorescenční jednotky jsou znázorněny v Tab. 5 a 6 a také v grafech (Obr. 19: A,B,C a 20 A,B,C). Jelikož naměřené údaje byly řádově odlišné, byly pro přehlednost rozděleny do více grafů.

Tab. 5: Fluorescenční jednotky představující tvorbu hybridního produktu, naměřené pomocí Synergy HT multi-mode microplate reader. Na papírovou matrici byly nanесeny reakční směsi obsahující různé oligosacharidy, XG a proteinový extrakt ze semen lichořeřišnice:

čas [hod]	XGOS-SR	LAOS-SR	PUOS-SR	CEOS-SR	MLGOS-SR
0	0	0	0	4 828	0
0,5	50 204	1 299	2 205	4 152	295,5
2	61 600	5 447	3 410	11 301	1 685,5
5	59 124	8 817	1 795	14 123	4 541,5
24	5 001	3 345,5	58	700	0

čas [hod]	OUA-SR	XYLOS-SR	AGOS-SR	GMOS-SR	MANOS-SR
0	0	0	0	5 902	0
0,5	0	703	591	27 044	2 087
2	40	2 108	971	31 553	1 588
5	49	2 502	764,5	26 341	354
24	0	128	0	0	0





Obr. 19 A,B,C: Grafické zobrazení fluorescenčních jednotek naměřených na Synergy HT multi-mode microplate reader. Na papírovou matrici byly nanesené reakční směsi obsahující různé oligosacharidy, XG a proteinový extrakt ze semen lichořeřišnice.

Získané údaje potvrdily výsledky po kvalitativní detekci pod UV světlem. Navíc byla detekována tvorba produktu i mezi substrátovými páry, u kterých nebyla detekována pozitivní reakce pod UV. Kdy šlo o páry XG/XYLOS-SR, XG/AGOS-SR a XG/MANOS.

Z grafů je patrné, že u páru XG/CEOS-SR opravdu docházelo k absorpci. Ta byla způsobená tím, že oligosacharid CEOS je odvozený od celulózy z které je složena papírová matrice. K absorpci docházelo také u páru XG/GMOS-SR.

V přítomnosti akceptorového páru OUA-SR nedocházelo k transglykozylační reakci, jelikož naměřené fluorescenční jednotky byly extrémně nízké.

Naopak u XGOS-SR, který je typickým substrátem pro transglykozylační reakce byly naměřeny vysoké hodnoty aktivit. Tyto aktivity byly na základě informací získaných z literatury očekávány a potvrdily správný průběh reakce.

U XG/LAOS-SR docházelo k postupnému vzrůstu aktivit, nejvyšší aktivita (8 817 F.U.) byla zaznamenána při 5 hod. Tento trend byl pozorován i u párů XG/MLGOS-SR a XG/XYLOS-SR. Nízké aktivity, které nepřesáhly hodnotu 971 F.U. byly naměřeny u XG/AGOS-SR, kdy po 2 hod. začala aktivita klesat.

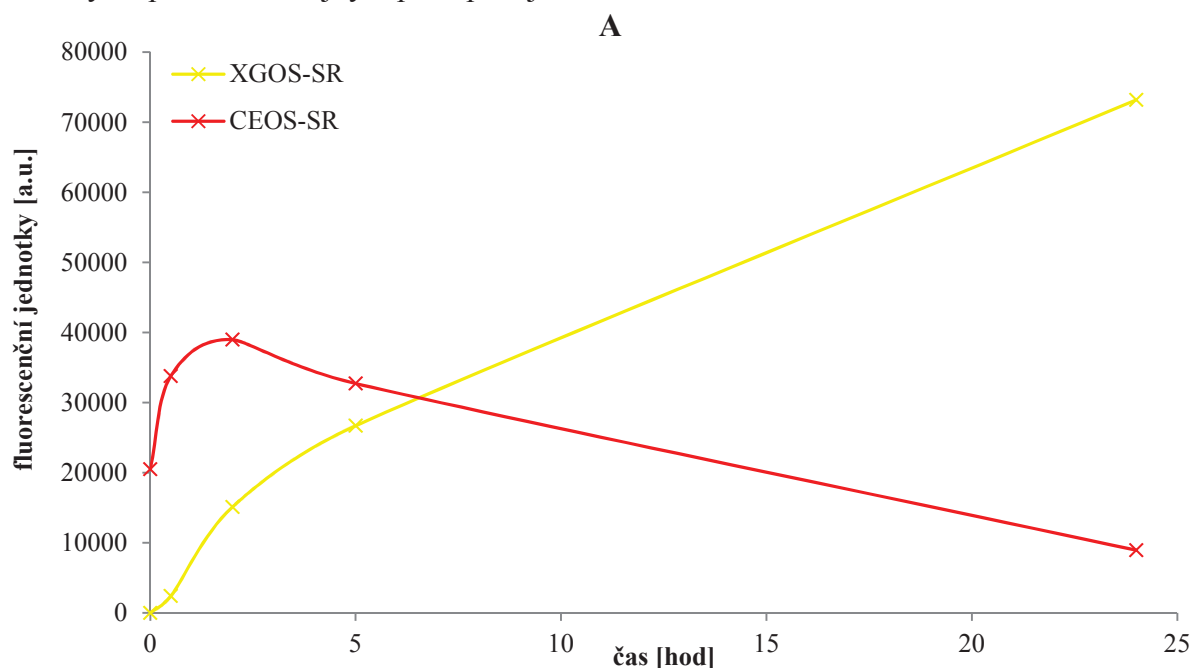
Z kvalitativního i kvantitativního vyhodnocení papírové metody vyplývá, že v proteinových extraktech ze semen lichořeřišnice byl nalezen heterotransglykozylační enzym/enzymy.

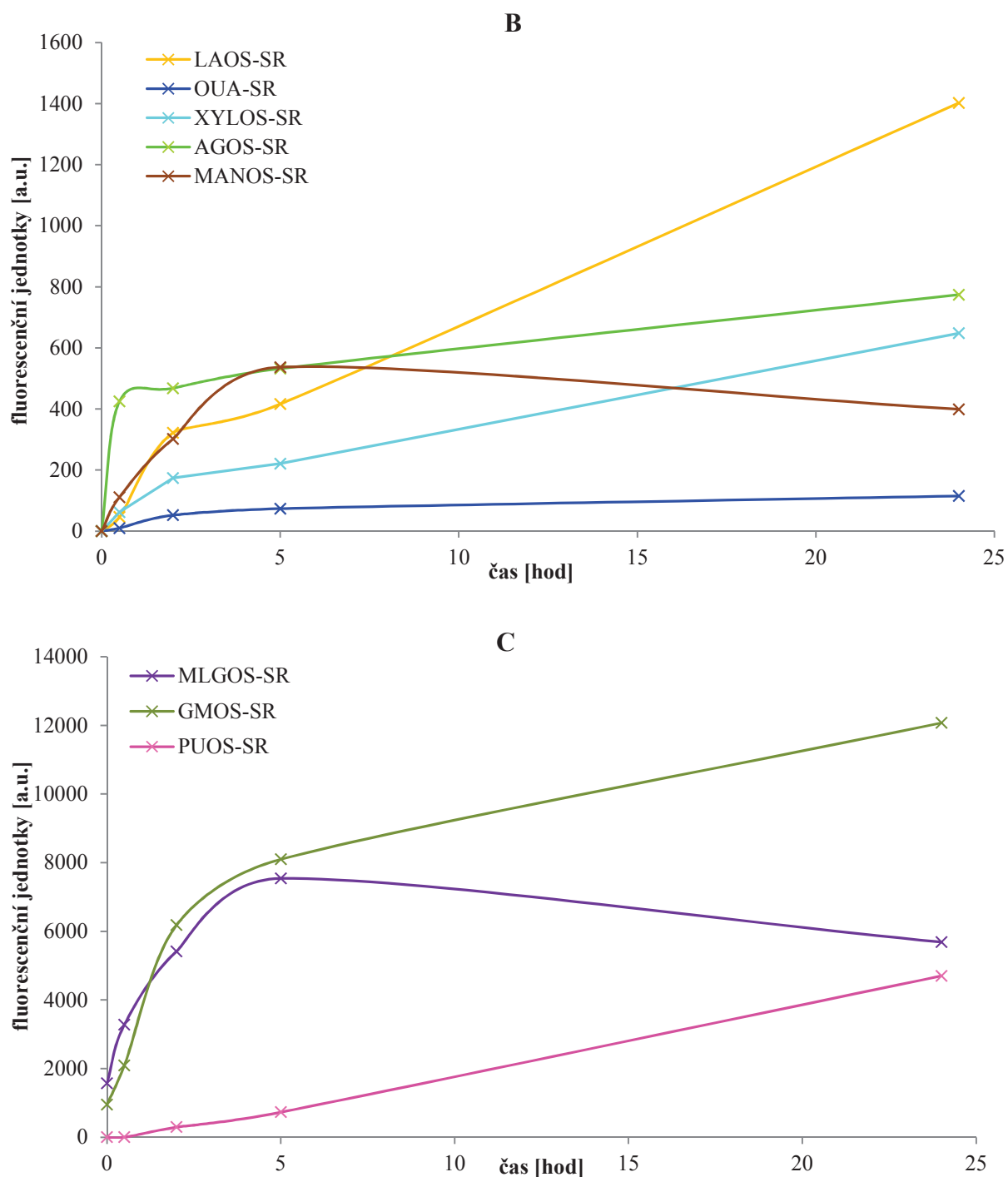
Tab. 6: Fluorescenční jednotky představující tvorbu hybridního produktu, naměřené pomocí Synergy HT multi-mode microplate reader. Na papírovou matrici byly naneseny reakční směsi obsahující různé oligosacharidy, XG a proteinový extrakt ze semen petržele:

čas [hod]	XGOS-SR	LAOS-SR	PUOS-SR	CEOS-SR	MLGOS-SR
0	0	0	0	20 493,5	1 570
1	2 399	46	0	33 795,5	3 276
2	15 102	322	294,5	38 992,5	5 415
5	26 703	416	730,5	32 732,5	7 539,5
24	73 199	1 402	4 699	8 954	5 685,5

čas [hod]	OUA-SR	XYLOS-SR	AGOS-SR	GMOS-SR	MANOS-SR
0	0	0	0	948	0
1	10	62	425	2091	111
2	52	174	468	6 180,5	302
5	73,5	221	532	8096	537
24	115	648	774	12 070	399

Data byla zpracována stejným postupem jako u XET získané z lichořeřišnice.





Obr. 20 A, B, C: Grafické zobrazení fluorescenčních jednotek naměřených na Synergy HT multi-mode microplate reader. Na papírovou matrici byly naneseny reakční směsi obsahující různé oligosacharidy, XG a proteinový extrakt ze semen petržele.

Ze získaných údajů je zřejmé, že podobně jako v případě reakčních směsí obsahujících proteinový extrakt z lichořeřišnice docházelo k absorpci CEOS-SR a GMOS-SR na papírovou matrici. Zde navíc docházelo k absorpci i u páru XG/MLGOS-SR. To potvrdilo výsledky získané kvalitativním vyhodnocením pod UV světlem.

Opět nejvyšší aktivita byla zaznamenána u XGOS-SR, který je typickým substrátem pro transglykozylační reakce, maximální aktivita dosahovala hodnot 73 199 F.U.

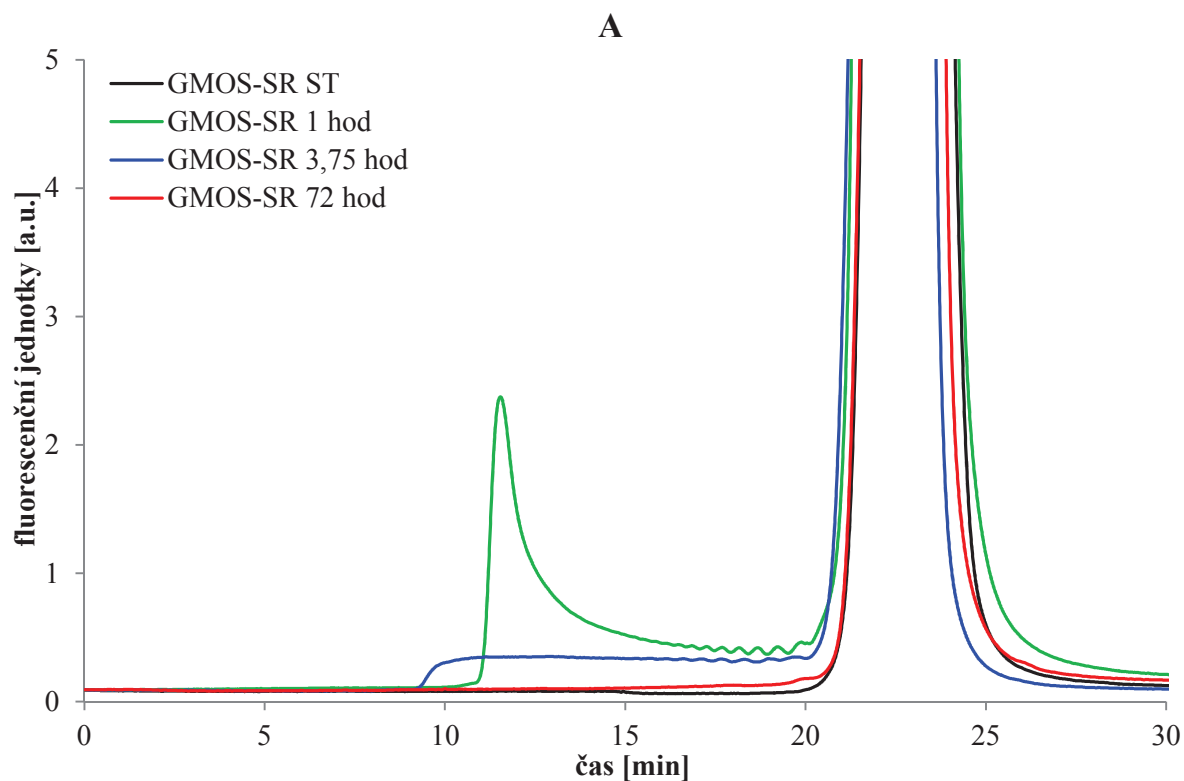
Obdobných výsledků jako u produktů, které vznikly reakcí s enzymem získaným z lichořeřišnice, bylo dosaženo i u OUA-SR. Aktivita zde byla nejnížší v porovnání z ostatními oligosacharidy. Reakci tedy nebylo možné považovat za reakci transglykozylační.

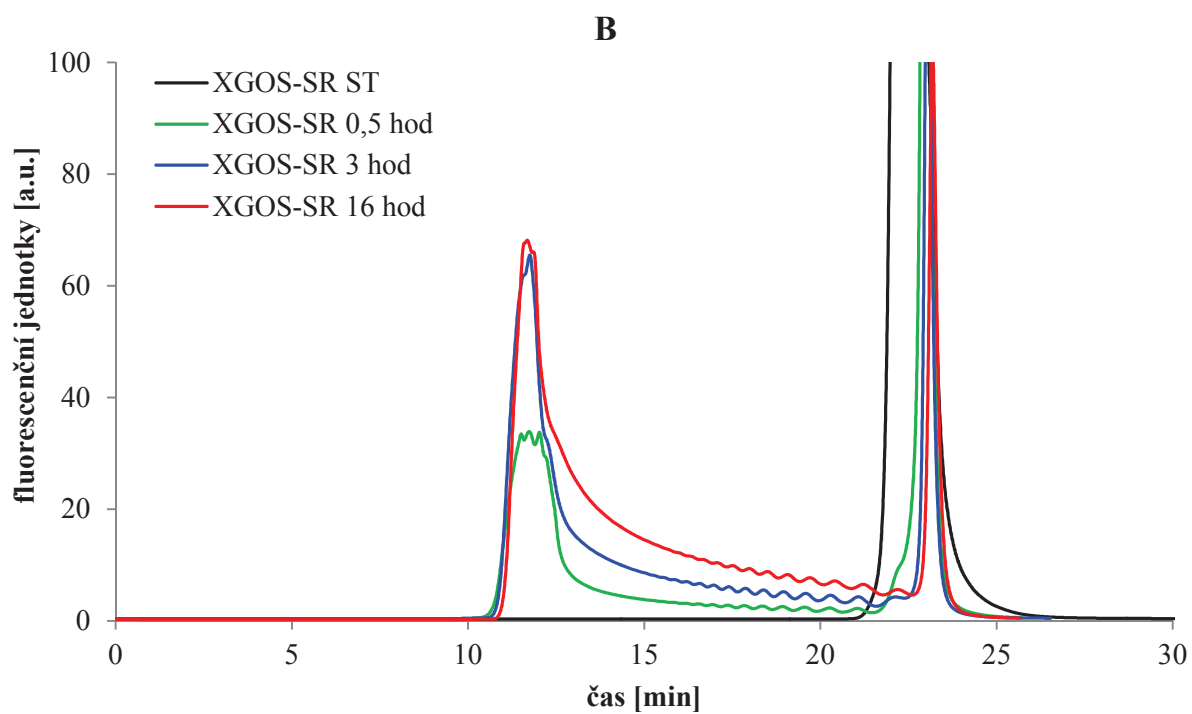
U párů XG/LAOS-SR, XG/XYLOS-SR a XG/AGOS-SR byl pozorován pomalý nárůst aktivity, kdy nejvyšší hodnoty byly zaznamenány ve 24 hod. U XG/MANOS-SR byla naopak nejvyšší hodnota zaznamenána v 5 hod, poté docházelo k poklesu aktivity.

Z kvalitativního i kvantitativního vyhodnocení papírové metody vyplývá, že v proteinových extraktech ze semen lichořeřišnice i petržele byly nalezeny heterotransglykozylační enzymy.

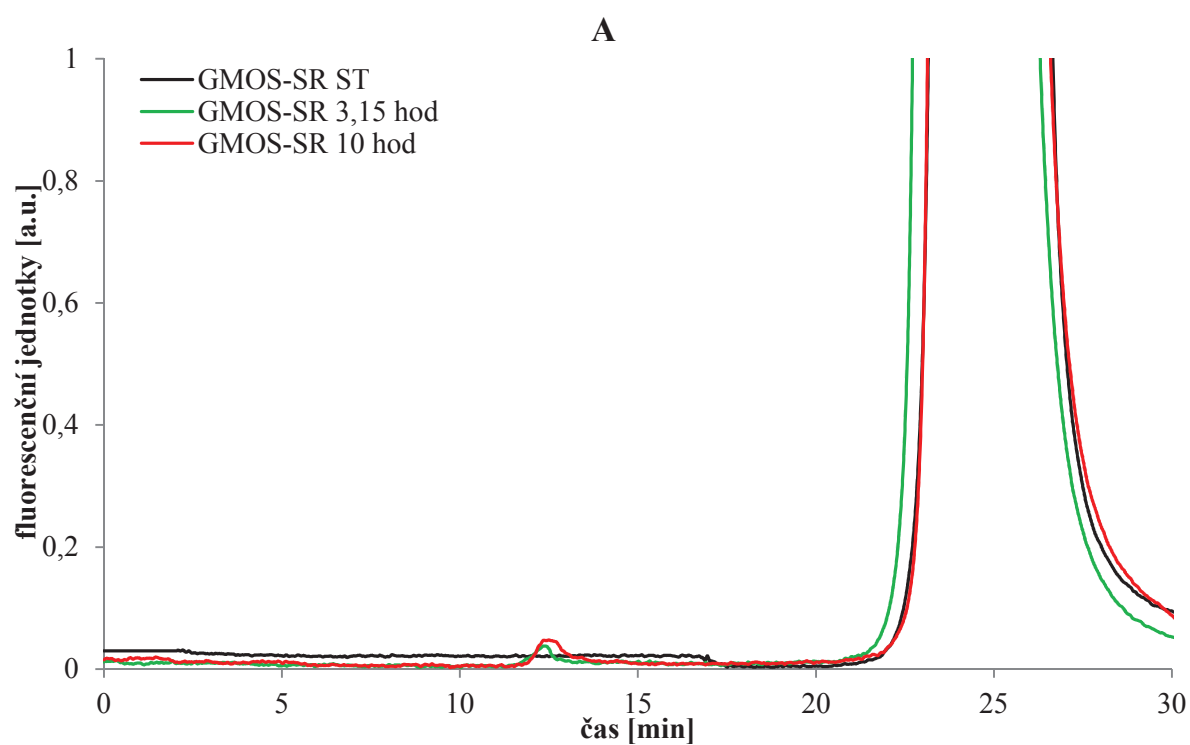
4.6.2 HPLC

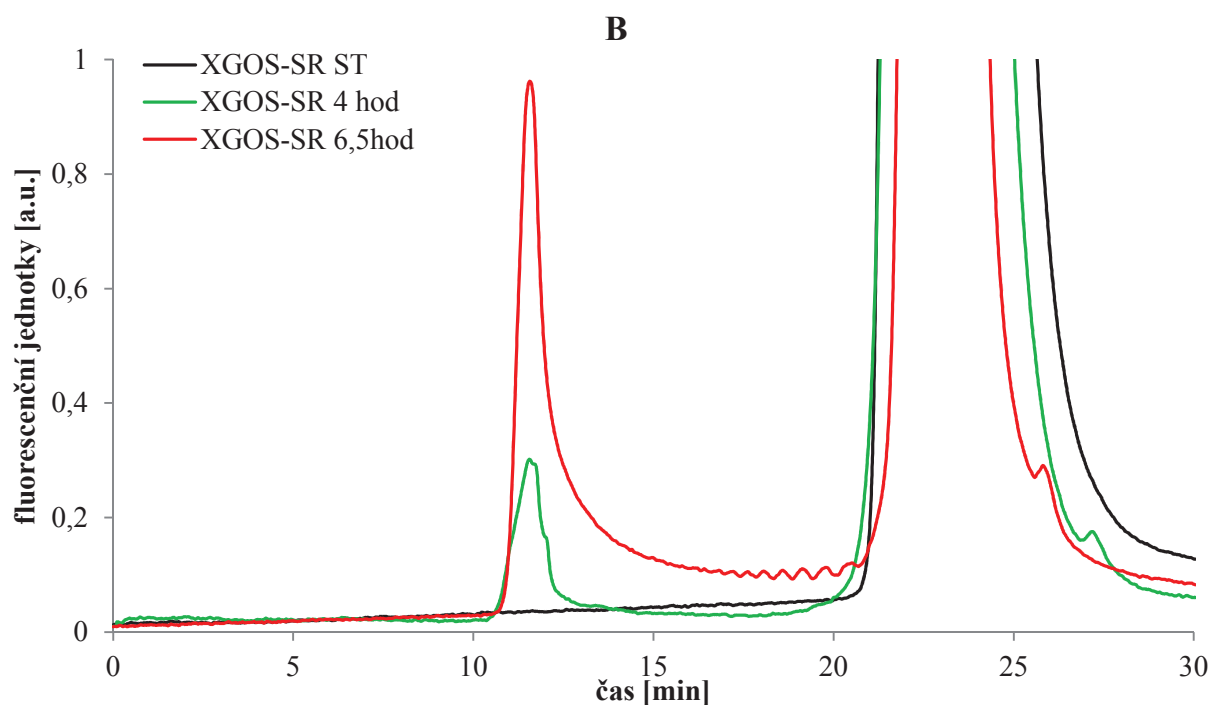
Jelikož v případě papírové metody docházelo k absorpci GMOS-SR na matrici, získané výsledky byly ověřeny pomocí metody HPLC. Analýzy byly uskutečněny pro přirozený substrátový pár XG/XGOS-SR a XG/GMOS-SR v přítomnosti proteinových extraktů ze semen lichořeřišnice a petržele.





Obr. 21 A, B: Eluční profil reakčních směsí obsahující XG jako donor, proteinový extrakt z lichořeřišnice a akceptorové substráty: A–GMOS-SR, B–XGOS-SR. Reakční směsi byly inkubované v různých časových intervalech a analyzované metodou HPLC.





Obr. 22 A, B: Eluční profil reakčních směsí obsahující XG jako donor, proteinový extrakt z petržele a akceptorové substráty: A–GMOS-SR, B–XGOS-SR. Reakční směsi byly inkubované v různých časových intervalech a analyzované metodou HPLC.

Naměřená fluorescence značeného produktu vznikajícího účinkem enzymu ze semen lichořeřišnice, byla vyšší pro substrátový pár XG/XGOS a narůstala s časem inkubace. Naopak v přítomnosti GMOS-SR docházelo k poklesu enzymové aktivity.

V případě enzymu získaného ze semen petržele docházelo v obou případech k nárůstu fluorescence. Aktivita tohoto enzymu byla v porovnání s enzymem z lichořeřišnice několikanásobně nižší. Eluční profily reakčních směsí potvrdily přítomnost heterotransglykozylačních enzymů v semenech studovaných rostlin.

5 ZÁVĚR

- Cílem této bakalářské práce byla příprava fluorescenčně značených oligosacharidů a detekce transglykozylačních/heterotransglykozylačních aktivit v semenech dvouděložných rostlin.
- Kvalita a složení značených oligosacharidů (XGOS-SR, LAOS-SR, CEOS-SR, AGOS-SR, GMOS-SR, MANOS-SR, PUOS-SR, MLGOS-SR, OUA-SR a XYLOS-SR) byly analyzovány pomocí TLC a MALDI-TOF MS. Tyto fluorescenčně značené oligosacharidy byly směsí oligosacharidů s různou molekulovou hmotností. Pomocí TLC byly charakterizovány majoritní fluorescenčně značené oligosacharidy. Metodou MALDI-TOF MS byly identifikovány další oligosacharidy s různou molekulovou hmotností, s nižší intenzitou.
- Připravené značené oligosacharidy byly použity jako akceptorové substráty na detekci transglykozylačních aktivit proteinových extraktů získaných ze semen Lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus*) a petržele Olomoucké dlouhé (*Petroselinum crispum*).
- Z klíčících semen studovaných rostlin byly vyizolovány proteinové extrakty, které obsahovaly transglykozylační enzymy. SDS elektroforézou a IEF-PAGE bylo potvrzeno, že v získaných proteinových extraktech byly nalezeny enzymy, kterým se připisuje transglykozylační aktivita. Metodou IEF-PAGE byly v extraktu ze semen lichořeřišnice identifikovány proteiny s hodnotou pI 6,3 a v extraktu ze semen petržele proteiny s pI 5,5; 5,3; 5,2 a 4,9. SDS elektroforézou byly identifikovány proteiny s velikostí ~30 kDa. Všechny tyto hodnoty odpovídaly rozsahu pI a velikosti XET enzymů uváděným v dostupných publikacích.
- Přítomnost transglykozylačních enzymů byla detekována pomocí papírové metody a HPLC. Účinkem enzymu/enzymů proteinového extraktu z lichořeřišnice i z petržele docházelo k reakci mezi všemi substrátovými páry, kromě páru XG/OUA-SR, u kterého k reakci nedocházelo. Kvalitativní i kvantitativní vyhodnocení potvrdilo přítomnost transglykozylačních/heterotransglykozylačních enzymů v semenech studovaných rostlin.
- Metodou HPLC bylo potvrzeno, že k transglykozylační reakci docházelo i mezi substrátovým párem XG/GMOS-SR. I navzdory tomu, že papírovou metodou byla detekována absorpce tohoto značeného oligosacharidu. Z výsledků je patrné, že enzymová aktivita, při použití enzymu z lichořeřišnice, byla u přirozeného substrátového páru XG/XGOS-SR vyšší než při využití enzymu z petržele.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] KĄCZKOWSKI, Jerzy. Structure, function and metabolism of plant cell wall. *Acta Physiologiae Plantarum*. 2003, vol. 25, issue 3, s. 287-305. DOI: 10.1007/s11738-003-0010-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-003-0010-7>
- [2] PROCHÁZKA, Stanislav. *Botanika: morfologie a fyziologie rostlin*. Vyd. 3., nezměn. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. ISBN 978-80-7375-125-8.
- [3] ŠETLÍK, SEIDLOVÁ a ŠANTRŮČEK. Fyziologie rostlin: Organogeneze. *Univerzita Karlova v Praze Přírodovědecká fakulta* [online]. 2001 [cit. 2013-09-12]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/kap01.pdf>
- [4] CARPITA, Nick, Mary TIERNEY a Malcolm CAMPBELL. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Cell Walls*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2001, s. 1. DOI: 10.1007/978-94-010-0668-2_1. Dostupné z: http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-94-010-0668-2_1
- [5] REITER, Wolf-Dieter. Arabidopsis thaliana as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiology and Biochemistry* [online]. 1998, vol. 36, 1-2, s. 167-176 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1016/S0981-9428(98)80101-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942898801010>
- [6] VORWERK, Sonja, Shauna SOMERVILLE a Chris SOMERVILLE. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science*. 2004, vol. 9, issue 4, s. 203-209. DOI: 10.1016/j.tplants.2004.02.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138504000512>
- [7] LAVOINE, Nathalie, Isabelle DESLOGES, Alain DUFRESNE a Julien BRAS. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2012, vol. 90, issue 2, s. 735-764. DOI: 10.1016/j.carbpol.2012.05.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014410.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x.171200447X>
- [8] CHEN, Wenshuai, Haipeng YU, Yixing LIU, Peng CHEN, Mingxin ZHANG a Yunfei HAI. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. *Carbohydrate Polymers*. 2011-02-01, vol. 83, issue 4, s. 1804-1811. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.10.040. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0144861710008532>

- [9] HAZLEWOOD, Geoffrey P. a Harry J. GILBERT. Structure and Function Analysis of Pseudomonas Plant Cell Wall Hydrolases. *Biochemical society transactions* [online]. London: Biochemical Society, 1998, roč. 26, č. 2, s. 185-190 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1016/S0079-6603(08)60828-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079660308608284>
- [10] NOVÁK, Jan a Milan SKALICKÝ. *Botanika: cytologie, histologie, organologie a systematika*. 3. vyd. Praha: Powerprint, 2012, s. 36-37. ISBN 978-80-87415-53-5.
- [11] WU, Baojian, Daoyin DENG, Yi LU a Wei WU. Biphasic release of indomethacin from HPMC/pectin/calcium matrix tablet: II. Influencing variables, stability and pharmacokinetics in dogs. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2008, vol. 69, issue 1, s. 294-302. DOI: 10.1016/j.ejpb.2007.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107003438>
- [12] WIETHÖLTER, Nicola, Barbara GRAEBNER, Manfred MIERAU, William G.T. WILLATS, J.Paul KNOX a Bruno M. MOERSCHBACHER. Isolation and characterisation of the homogalacturonan from type II cell walls of the commelinoid monocot wheat using HF-solvolysis. *Carbohydrate Research*. 2003, vol. 338, issue 5, s. 423-431. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00498-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621502004986>
- [13] WILLATS, William G.T., Lesley MCCARTNEY, William MACKIE a J. Paul KNOX. Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology* [online]. 2001, roč. 47, 1-2, s. 9-27 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1023/a:1010662911148. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1023/A:1010662911148>
- [14] ROPERS, M.H. a T. LEROY. Calcium bridges in fatty acid/pectin assemblies. *Food Hydrocolloids*. 2008, vol. 22, issue 7, s. 1396-1403. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2007.08.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X07002020>
- [15] MARCUS, Susan E, Yves VERHERTBRUGGEN, Cécile HERVÉ, José J ORDAZ-ORTIZ, Vladimir FARKAS, Henriette L PEDERSEN, William GT WILLATS a J Paul KNOX. Pectic homogalacturonan masks abundant sets of xyloglucan epitopes in plant cell walls. *BMC Plant Biology*. 2008, vol. 8, issue 1, s. 60-. DOI: 10.1186/1471-2229-8-60. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/60>
- [16] EGÜÉS, Itziar, Arantxa ECEIZA a Jalel LABIDI. Effect of different hemicelluloses characteristics on film forming properties. *Industrial Crops and Products* [online]. 2013,

- roč. 47, s. 331-338 [cit. 2014-05-07]. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.03.031. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901300160X>
- [17] SUN, Run-Cang. *Cereal straw as a resource for sustainable biomaterials and biofuels: chemistry, extractives, lignins, hemicelluloses and cellulose*. 1st ed. Amsterdam: Elsevier, 2010. ISBN 978-044-4532-343.
- [18] THOMPSON, James E. a Stephen C. FRY. Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*. 2000-7-14, vol. 211, issue 2, s. 275-286. DOI: 10.1007/s004250000287. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004250000287>
- [19] SIMI, Chandroth Kalyad a Tholath Emilia ABRAHAM. Transparent xyloglucan–chitosan complex hydrogels for different applications. *Food Hydrocolloids*. 2010, vol. 24, issue 1, s. 72-80. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2009.08.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X09001660>
- [20] BORKOVICH, Katherine A a Daniel J EBBOLE. *Cellular and molecular biology of filamentous fungi*. Washington, DC: ASM Press, c2010, xiii, 788 p. ISBN 15-558-1473-5.
- [21] NISBET, D.R., K.E. CROMPTON, S.D. HAMILTON, S. SHIRAKAWA, R.J. PRANKERD, D.I. FINKELSTEIN, M.K. HORNE a J.S. FORSYTHE. Morphology and gelation of thermosensitive xyloglucan hydrogels. *Biophysical Chemistry*. 2006, vol. 121, issue 1, s. 14-20. DOI: 10.1016/j.bpc.2005.12.005. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301462205003340>
- [22] The University of Georgia. *Complex Carbohydrate Research Center* [online]. 20.8.2007 [cit. 2014-02-11]. Dostupné z: <http://www.ccrc.uga.edu/~mao/xgnom/nomen.html>
- [23] NISHITANI, Kazuhiko. Construction and restructuring of the cellulose-xyloglucan framework in the apoplast as mediated by the xyloglucan-related protein family—A hypothetical scheme. *Journal of Plant Research*. 1998, vol. 111, issue 1, s. 159-166. DOI: 10.1007/BF02507162. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF02507162>
- [24] ROSE, Jocelyn K.C a Alan B BENNETT. Cooperative disassembly of the cellulose–xyloglucan network of plant cell walls: parallels between cell expansion and fruit ripening. *Trends in Plant Science*. 1999, vol. 4, issue 5, s. 176-183. DOI: 10.1016/S1360-1385(99)01405-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138599014053>
- [25] PAULY, Markus, Peter ALBERSHEIM, Alan DARVILL a William S. YORK. Molecular domains of the cellulose/xyloglucan network in the cell walls of higher

- plants. *The Plant Journal*. 1999, vol. 20, issue 6, s. 629-639. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1999.00630.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1999.00630.x>
- [26] SASIDHARAN, Rashmi, Laurentius VOESENEK a Ronald PIERIK. Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2011, vol. 30, issue 6, s. 548-562. DOI: 10.1080/07352689.2011.615706. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352689.2011.615706>
- [27] COSGROVE. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*. 2000, roč. 407, č. 6802, s. 321-326. DOI: 10.1038/35030000. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942800001649>
- [28] ŠETLÍK, SEIDLOVÁ a ŠANTRŮČEK. Regulace růstu. In: *Katedra Experimentální Biologie Rostlin* [online]. 2006, last modified 16 may 2012 [cit. 2013-11-13]. Dostupné z: http://kebr.prf.jcu.cz/download/lectures/KFR220/KFR220_S02.pdf
- [29] CHEN, Jin-Gui, Shucai WANG, Colin M. LAZARUS, Richard M. NAPIER a Alan M. JONES. Altered Expression of Auxin-binding Protein 1 Affects Cell Expansion and Auxin Pool Size in Tobacco Cells. *Journal of Plant Growth Regulation*. 2006, vol. 25, issue 1, s. 69-78. DOI: 10.1007/s00344-005-0049-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00344-005-0049-3>
- [30] PERROT-RECHENMANN, C. Cellular Responses to Auxin: Division versus Expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010-05-03, vol. 2, issue 5, a001446-a001446. DOI: 10.1101/cshperspect.a001446. Dostupné z: <http://cshperspectives.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/cshperspect.a001446>
- [31] RAYLE, D. L., R. E. CLELAND. The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*. 1992-08-01, vol. 99, issue 4, s. 1271-1274. DOI: 10.1104/pp.99.4.1271. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.99.4.1271>
- [32] FRY, SC, RC SMITH, KF RENWICK, DJ MARTIN, SK HODGE a KJ MATTHEWS. Xyloglucan endotransglycosylase, a new wall-loosening enzyme-activity from plants. *Biochemical journal*. 15.3.1992, roč. 282, s. 821-828. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=9&SID=Q2Tx9JZYva9qDLerAJF&page=1&doc=2
- [33] NISHITANI, Kazuhiko a Rumi TOMINGA. Endo-xyloglucan Transferase, a Novel Class of Glycosyltransferase That Catalyzes Transfer of a Segment of Xyloglucan Molecule to Another Xyloglucan Molecule*. *The Journal of biological chemistry*. 1992,

- [34] FARKAS, Vladimir, Zdena SULOVA, Eva STRATILOVA, Rami HANNA a Gordon MACLACHLAN. Cleavage of xyloglucan by nasturtium seed xyloglucanase and transglycosylation to xyloglucan subunit oligosaccharides. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1992, vol. 298, issue 2, s. 365-370. DOI: 10.1016/0003-9861(92)90423-T. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000398619290423T>
- [35] SCHRÖDER, Roswitha, Teresa F. WEGRZYN, Karen M. BOLITHO a Robert J. REDGWELL. Mannan transglycosylase: a novel enzyme activity in cell walls of higher plants. *Planta*. 2004, vol. 219, issue 4, 590–600. DOI: 10.1007/s00425-004-1274-x. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-004-1274-x>
- [36] FRY, Stephen C., Kyle E. MOHLER, Bertram H.W.A. NESSELRODE a Lenka FRANKOV. Mixed-linkage β -glucan : xyloglucan endotransglucosylase, a novel wall-remodelling enzyme from Equisetum (horsetails) and charophytic algae. *The Plant Journal*. 2008, vol. 55, issue 2, s. 240-252. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03504.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2008.03504.x>
- [37] JOHNSTON, Sarah L., Roneel PRAKASH, Nancy J. CHEN, Monto H. KUMAGAI, Helen M. TURANO, Janine M. COONEY, Ross G. ATKINSON, Robert E. PAULL, Roshan CHEETAMUN, Antony BACIC, David A. BRUMMELL a Roswitha SCHRÖDER. An enzyme activity capable of endotransglycosylation of heteroxylan polysaccharides is present in plant primary cell walls. *Planta*. 2013, vol. 237, issue 1, s. 173-187. DOI: 10.1007/s00425-012-1766-z. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-012-1766-z>
- [38] ROSE, J. K. C., J. BRAAM, S. C. FRY a K. NISHITANI. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: Current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant and Cell Physiology*. 2002, vol. 43, issue 12, s. 1421-1435. DOI: 10.1093/pcp/pcf171. Dostupné z: <http://pcp.oupjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcf171>
- [39] HRMOVA, Maria, Vladimir FARKAS, Andrew J. HARVEY, Jelle LAHNSTEIN, Bente WISCHMANN, Nomchit KAEWTHAI, Inés EZCURRA, Tuula T. TEERI a Geoffrey B. FINCHER. Substrate specificity and catalytic mechanism of a xyloglucan xyloglucosyl transferase HvXET6 from barley (*Hordeum vulgare* L.). *FEBS Journal*. 2009, vol. 276, issue 2, s. 437-456. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06791.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2008.06791.x>

- [40] Carbohydrate Active Enzymes database [online]. 1998, 29. 8. 2013 [10.9.2013]. <http://www.cazy.org/> Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res* 37:D233-238 [PMID: 18838391]
- [41] STROHMEIER, Marco, Maria HRMOVA, Markus FISCHER, Andrew J. HARVEY, Geoffrey B. FINCHER a Jürgen PLEISS. Molecular modeling of family GH16 glycoside hydrolases: Potential roles for xyloglucan transglucosylases/hydrolases in cell wall modification in the poaceae. *Protein Science*. 2004, vol. 13, issue 12, s. 3200-3213. DOI: 10.1110/ps.04828404. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1110/ps.04828404>
- [42] BARBEYRON, T., A. GERARD, P. POTIN, B. HENRISSAT a B. KLOAREG. The kappa-carrageenase of the marine bacterium *Cytophaga drobachiensis*. Structural and phylogenetic relationships within family-16 glycoside hydrolases. *Molecular biology and evolution*. 1998, roč. 15, č. 5, s. 528-537. Dostupné z: http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=24&SID=Y2ZcKn2juLHHdU8V1B5&page=1&doc=1
- [43] SULOVÁ, Zdena a Vladimír FARKAŠ. Purification of Xyloglucan Endotransglycosylase Based on Affinity Sorption of the Active Glycosyl-Enzyme Intermediate Complex to Cellulose. *Protein Expression and Purification*. 1999, vol. 16, issue 2, s. 231-235. DOI: 10.1006/prep.1999.1043. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592899910434>
- [44] BARAN, R., Z. SULOVÁ, E. STRATILOVÁ a V. FARKAŠ. Ping-pong character of nasturtium-seed xyloglucan endotransglycosylase (XET) reaction. *General physiology and biophysics: an international journal*. Bratislava: VEDA, 2000, roč. 19, č. 4, s. 427-440.
- [45] KOSÍK, Ondřej, Soňa GARAJOVÁ, Mária MATULOVÁ, Pavel ŘEHULKA, Eva STRATILOVÁ a Vladimír FARKAŠ. Effect of the label of oligosaccharide acceptors on the kinetic parameters of nasturtium seed xyloglucan endotransglycosylase (XET). *Carbohydrate Research*. 2011, vol. 346, issue 2, s. 357-361. DOI: 10.1016/j.carres.2010.09.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621510003757>
- [46] SULOVÁ, Zdena, Richard BARAN a Vladimír FARKAŠ. Release of complexed xyloglucan endotransglycosylase (XET) from plant cell walls by a transglycosylation reaction with xyloglucan-derived oligosaccharides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2001, vol. 39, issue 11, s. 927-932. DOI: 10.1016/S0981-9428(01)01313-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942801013134>

- [47] TOIKKANEN, Jaana H., Marja-Leena NIKU-PAAVOLA, Michael BAILEY, Juha IMMANEN, Eija RINTALA, Paula ELOMAA, Yrjö HELARIUTTA, Teemu H. TEERI a Richard FAGERSTRÖM. Expression of xyloglucan endotransglycosylases of *Gerbera hybrida* and *Betula pendula* in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*. 2007, vol. 130, issue 2, s. 161-170. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2007.03.004. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165607001939>
- [48] SCHRÖDER, R., R. G. ATKINSON, G. LANGENKÄMPER a R. J. REDGWELL. Biochemical and molecular characterisation of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta*. 1998-1-22, vol. 204, issue 2, s. 242-251. DOI: 10.1007/s004250050253. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s004250050253>
- [49] NAKATSUKA, Akira, Tsuyoshi MARUO, Chihiro ISHIBASHI, Yosuke UEDA, Nobuo KOBAYASHI, Masumi YAMAGISHI a Hiroyuki ITAMURA. Expression of genes encoding xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase in ‘Saijo’ persimmon fruit during softening after deastringency treatment. *Postharvest Biology and Technology*. 2011, vol. 62, issue 1, s. 89-92. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2011.04.012. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925521411001049>
- [50] UOZU, S. Characterization of XET-Related Genes of Rice. *Plant physiology*. 2000, vol. 122, issue 3, s. 853-860. DOI: 10.1104/pp.122.3.853. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.122.3.853>
- [51] SCHUNMANN, P. H. D., R. C. SMITH, V. LANG, P. R. MATTHEWS a P. M. CHANDLER. Expression of XET-related genes and its relation to elongation in leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant, Cell and Environment*. 1997, vol. 20, issue 12, s. 1439-1450. DOI: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-49.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-49.x>
- [52] NISHIKUBO, N., T. AWANO, A. BANASIAK, V. BOURQUIN, F. IBATULLIN, R. FUNADA, H. BRUMER, T. T. TEERI, T. HAYASHI, B. SUNDBERG a E. J. MELLEROWICZ. Xyloglucan Endo-transglycosylase (XET) Functions in Gelatinous Layers of Tension Wood Fibers in Poplar--A Glimpse into the Mechanism of the Balancing Act of Trees. *Plant and Cell Physiology*. 2007-04-22, vol. 48, issue 6, s. 843-855. DOI: 10.1093/pcp/pcm055. Dostupné z: <http://pcp.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/pcp/pcm055>
- [53] BOLLOK, Monika, Hongbin HENRIKSSON, Åsa KALLAS, Mehmedalija JAHIC, Tuula T. TEERI a Sven-Olof ENFORS. Production of poplar xyloglucan endotransglycosylase using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, vol. 126, issue 1, s. 61-77. DOI: 10.1007/s12010-005-0006-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-005-0006-4>

- [54] STEELE, Nancy M a Stephen C FRY. Differences in catalytic properties between native isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase (XET). *Phytochemistry*. 2000, vol. 54, issue 7, s. 667-680. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00203-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003194220000203X>
- [55] EDWARDS, Mary, Iain DEA a Paul BULPIN. Purification and Properties of a Novel Xyloglucan-specific Endo-(1,4)-beta-D-glucanase from Germinated Nasturtium Seeds (*Tropaeolum majus* L.). *The Journal of Biological Chemistry*. 1986, roč. 261, č. 20, s. 9489-9494. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/261/20/9489.long>
- [56] STEELE, N.M., Z. SULOVA, P. CAMPBELL, J. BRAAM, V. FARKAS a S.C. FRY. Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. *Biochemical journal*. 1. 5. 2001, roč. 355, č. 3, s. 671-679.
- [57] FRY, Stephen C., William S. YORK, Peter ALBERSHEIM, Alan DARVILL, Takahisa HAYASHI, Jean-Paul JOSELEAU, Yoji KATO, Ester Perez LORENCES, Gordon A. MACLACHLAN, Michael MCNEIL, Andrew J. MORT, J. S. GRANT REID, Hanns Ulrich SEITZ, Robert R. SELVENDRAN, Alphons G. J. VORAGEN a Alan R. WHITE. An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiologia Plantarum*. 1993, vol. 89, issue 1, s. 1-3. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1993.tb01778.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01778.x>
- [58] EDWARDS, Mary, Iain C. M. DEA, Paul V. BULPIN a J. S. Grant REID. Purification and Properties of a Novel Xyloglucan-specific Endo-(1,4)-β-D-glucanase from Germinated Nasturtium Seeds (*Tropaeolum majus* L.). *Journal of biological chemistry*. 1986, roč. 261, č. 20, 9489 -9494. Dostupné z: <http://www.jbc.org/content/261/20/9489.long>
- [59] ANTOSIEWICZ, D., M.M. PURUGGANAN, D.H. POLISENSKY a J. BRAAM. Cellular localization of Arabidopsis xyloglucan endotransglycosylase- related proteins during development and after wind stimulation. *Plant physiology*. Palo Alto: Annual Reviews, 1997, roč. 115, č. 4, s. 1319-1328. DOI: 10.1104/pp.115.4.1319. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.115.4.1319>
- [60] DIXON, Malcolm a Edwin WEBB. *Enzymes*. 2nd ed. (completely rev.). London: Longmans, 1964, s. 1. ISBN 0582462142.
- [61] MATSUMOTO, Takehiko, Fukumi SAKAI a Takahisa HAYASH. A xyloglucan-specific endo-1,4-beta-glucanase isolated from Auxin-treated Pea stems. *Plant*

- Physiology*. 1997, roč. 114, č. 2, s. 661-667. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/114/2/661.full.pdf+html>
- [62] SILVA, Jacqueline, Carl D. JARMAN, David A. ARROWSMITH, Morag S. STRONACH, Sumant CHENGAPPA, Chris SIDEBOTTOM a J.S. Grant REID. Molecular characterization of a xyloglucan-specific endo-(14)-beta-d-glucanase (xyloglucan endo-transglycosylase) from nasturtium seeds. *The Plant Journal*. 1993, vol. 3, issue 5, s. 701-711. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1993.03050701.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1993.03050701.x>
- [63] SULOVÁ, Zdena, Richard BARAN a Vladimír FARKAŠ. Divergent modes of action on xyloglucan of two isoenzymes of xyloglucan endo-transglycosylase from *Tropaeolum majus*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003, vol. 41, issue 5, s. 431-437. DOI: 10.1016/S0981-9428(03)00050-0. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942803000500>
- [64] PURUGGANAN, M., J. BRAAM a S.C. FRY. The Arabidopsis TCH4 xyloglucan endotransglycosylase. Substrate specificity, pH optimum, and cold tolerance. *Plant physiology*. 1997, roč. 115, č. 1, s. 181-190. DOI: 10.1104/pp.115.1.181. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.115.1.181>
- [65] HRMOVA, M., V. FARKAS, J. LAHNSTEIN a G. B. FINCHER. A Barley Xyloglucan Xyloglucosyl Transferase Covalently Links Xyloglucan, Cellulosic Substrates, and (1,3;1,4)-beta-D-Glucans. *Journal of Biological Chemistry*. 2007-03-07, vol. 282, issue 17, s. 12951-12962. DOI: 10.1074/jbc.M611487200. Dostupné z: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M611487200>
- [66] STRATILOVÁ, Eva, Fairouz AIT-MOHAND, Pavel ŘEHULKA, Soňa GARAJOVÁ, Dana FLODROVÁ, Helena ŘEHULKOVÁ a Vladimír FARKAŠ. Xyloglucan endotransglycosylases (XETs) from germinating nasturtium (*Tropaeolum majus*) seeds: Isolation and characterization of the major form. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2010, vol. 48, issue 4, s. 207-215. DOI: 10.1016/j.plaphy.2010.01.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942810000227>
- [67] SULOVA, Z., M. LEDNICKA a V. FARKAS. A Colorimetric Assay for Xyloglucan-Endotransglycosylase from Germinating Seeds. *Analytical Biochemistry*. 1995, vol. 229, issue 1, s. 80-85. DOI: 10.1006/abio.1995.1381. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269785713814>
- [68] KALLAS, Åsa M., Kathleen PIENS, Stuart E. DENMAN, Hongbin HENRIKSSON, Jenny FÄLDT, Patrik JOHANSSON, Harry BRUMER a Tuula T. TEERI. Enzymatic properties of native and deglycosylated hybrid aspen (*Populus tremula*×*tremuloides*) xyloglucan endotransglycosylase 16A expressed in *Pichia pastoris*. *Biochemical*

- Journal*. 2005, vol. 390, issue 1, s. 105-113. DOI: 10.1042/BJ20041749. Dostupné z: <http://www.biochemj.org/bj/390/bj3900105.htm>
- [69] KOSÍK, Ondřej a Vladimír FARKAŠ. One-pot fluorescent labeling of xyloglucan oligosaccharides with sulforhodamine. *Analytical Biochemistry*. 2008, vol. 375, issue 2, s. 232-236. DOI: 10.1016/j.ab.2007.11.025. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269707007737>
- [70] FRY, Stephen C. Novel 'dot-blot' assays for glycosyltransferases and glycosylhydrolases: optimization for xyloglucan endotransglycosylase (XET) activity. *The Plant Journal*. 1997, vol. 11, issue 5, s. 1141-1150. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-313X.1997.11051141.x>
- [71] TAKEDA, Takumi, Janice G. MILLER a Stephen C. FRY. Anionic derivatives of xyloglucan function as acceptor but not donor substrates for xyloglucan endotransglucosylase activity. *Planta*. 2008, vol. 227, issue 4, s. 893-905. DOI: 10.1007/s00425-007-0665-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00425-007-0665-1>
- [72] LUCYSZYN, N., A.F. LUBAMBO, K.F. MATOS, I. MARVILLA, C.F. SOUZA a M.-R. SIERAKOWSKI. Specific modification of xyloglucan from *Hymenaea courbaril* seeds. *Materials Science and Engineering: C*. 2009, vol. 29, issue 2, s. 552-558. DOI: 10.1016/j.msec.2008.10.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493108002841>
- [73] MOHAND, Fairouz Ait a Vladimír FARKAŠ. Screening for hetero-transglycosylating activities in extracts from nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Carbohydrate Research*. 2006, vol. 341, issue 5, s. 577-581. DOI: 10.1016/j.carres.2006.01.018. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0008621506000243>
- [74] KOSÍK, Ondřej, Richard P. AUBURN, Steven RUSSELL, Eva STRATILOVÁ, Soňa GARAJOVÁ, Maria HRMOVA a Vladimír FARKAŠ. Polysaccharide microarrays for high-throughput screening of transglycosylase activities in plant extracts. *Glycoconjugate Journal*. 2010, vol. 27, issue 1, s. 79-87. DOI: 10.1007/s10719-009-9271-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10719-009-9271-8>
- [75] GARAJOVÁ, Soňa, Dana FLODROVÁ, Fairouz AIT-MOHAND, Vladimír FARKAŠ a Eva STRATILOVÁ. Characterization of two partially purified xyloglucan endotransglycosylases from parsley (*Petroselinum crispum*) roots. *Biologia*. 2008, vol. 63, issue 3, s. 313-319. DOI: 10.2478/s11756-008-0067-2. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11756-008-0067-2>

- [76] HAYWORTH, Douglas. Dialysis Methods for Protein Research. In: *Pierce Protein Biology Products* [online]. © 2014 [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://www.piercenet.com/method/dialysis-methods-protein-research>
- [77] SNOWMAN, John a Mizrahi AVSHALOM. *Downstream processes: equipment and techniques: Lyophilization: Freeze-Drying*. New York: A. Liss, 1988, s. 315-351. ISBN 0845132075.
- [78] Sublimace: Lyofilizace. In: *Vyšší odborná škola zdravotnická a Střední zdravotnická škola Hradec Králové: Laboratorní technika* [online]. [cit. 2014-02-24]. Dostupné z: <http://lat.zshk.cz/vyuka/sublimace.aspx>
- [79] CHURÁČEK, Jaroslav, Pavel JANDERA, Ján KRUPČÍK, Jozef POLONSKÝ, Milan POPL a František VLÁČIL. *Analytická separace látek*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1990, 384 s. ISBN 80-030-0569-8.
- [80] OPEKAR, František, Ivan JELÍNEK, Petr RYCHLOVSKÝ a Zbyněk PLZÁK. *Základní analytická chemie: pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2003, 201 s. ISBN 80-246-0553-8.
- [81] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [82] PISKAČ, Pavel, Marie CHALUPOVÁ a Šárka PROKOPCOVÁ. *Český lékopis 1997: Elektroforéza* [online]. © 2002-3 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_31.htm
- [83] KRÁLOVÁ, Blanka, Ladislav FUKAL, Pavel RAUCH a Tomáš RUML. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [84] SDS polyakrylamidová gelová elektroforéza (SDS PAGE). In: *Chemistry Department Faculty of Science Masaryk University: Metody chemického výzkumu - laboratorní cvičení* [online]. 2009, 17.12.2009 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/EF/SDSPAGE%20kolecko.pdf
- [85] WAGNER, Kerstin. Bioinformatics. In: *Homepage Dr. Kerstin Wagner* [online]. © 2003, 28.10.2009 [cit. 2014-02-23]. Dostupné z: http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html
- [86] CREIGHTON, Thomas E. *The physical and chemical basis of molecular biology*. Great Britain: Helvetian Press, 2010, xxxix, 642 s. ISBN 978-095-6478-108.

- [87] REDDY, C.A. *Methods for general and molecular microbiology*. 3rd ed. Washington, D.C.: ASM Press, ©2007, xix, 1069 p. ISBN 15-558-1223-6.
- [88] BANON-MANEUS, Elisenda, Luis F. QUINTANA a Josep M. CAMPISTOL. Urinary Proteomics and Renal Transplantation. *Kidney Transplantation - New Perspectives*. InTech, 23.8.2011, č. 1. DOI: 10.5772/23715. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/kidney-transplantation-new-perspectives/urinary-proteomics-and-renal-transplantation>
- [89] CLARK, Jim. High Performance Liquid Chromatography - HPLC. *Chemguide* [online]. © 2007, 2013 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>
- [90] HPLCweb. *HPLCweb: High-Performance Liquid Chromatography* [online]. © 2002-2007 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: http://www.hplcweb.com/About_Chromatography/
- [91] DOUŠA, Michal. Teorie HPLC / Základy HPLC. *HPLC.CZ* [online]. © 1999-2013, 4.4.2013 [cit. 2014-02-25]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>
- [92] *Chemické listy: Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS)*. Praha: Česká společnost chemická, 1997, roč. 92, č. 5. ISSN 0009-2770. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/common/articles.html>
- [93] PISKAČ, Pavel, Marie CHALUPOVÁ a Šárka PROKOPCOVÁ. Český lékopis 1997: Tenkovrstvá chromatografie. *Český lékopis 1997: 1. díl, Obecná část* [online]. [2. vyd.]. Praha: Grada, 1997 [cit. 2014-02-21]. Dostupné z: http://www.lekopis.cz/Kap_2_2_27.htm
- [94] FANALI, Salvatore, Paul R. HADDAD, Colin F. POOLE, Peter SCHOENMAKERS a David LLOYD. *Liquid chromatography: applications*. USA: Elsevier, ©2013, xiii, 667 p. ISBN 978-012-4158-061.
- [95] HOLČAPEK, Michal. Mass Spectrometry Group @ University of Pardubice. *Mass Spectrometry Group* [online]. © 2006-2014 [cit. 2014-03-24]. Dostupné z: <http://holcapek.upce.cz/>
- [96] Maldi. In: *Nijmegen Proteomics* [online]. [2001] [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: http://www.proteomicsnijmegen.nl/Maldi_pages/Maldi-about.htm
- [97] *National High Magnetic Field Laboratory* [online]. © 1995–2014 [cit. 2014-03-02]. Dostupné z: http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_maldi.html

- [98] ZEMKOVÁ, Zuzana, Soňa GARAJOVÁ, Dana FLODROVÁ, Pavel ŘEHULKA, Ivan ZELKO, Renáta VADKERTIOVÁ, Vladimír FARKAŠ a Eva STRATILOVÁ. Incorporation of β -(1,6)-linked glucooligosaccharides (pustulooligosaccharides) into plant cell wall structures. *Chemical Papers*. 2012, vol. 66, issue 9, s. 814-820. DOI: 10.2478/s11696-012-0167-x. Dostupné z: <http://www.springerlink.com/index/10.2478/s11696-012-0167-x>
- [99] GARAJOVÁ, Soňa. *Izolácia a vlastnosti rastlinných transglykozyláz*. Bratislava, 2009. Dizertačná práca. Slovenská technologická univerzita v Bratislave. Vedoucí práce Eva Stratilová.

7 SEZNAM ZKRATEK

AGOS	- arabinogalaktooligosacharidy
AGOS-SR	- arabinogalaktooligosacharidy značené sulforodaminem
APS	- peroxodisíran amonný
CAZy	- databáze pro glykozylyhydrolázy založená na podobnosti sekvencí (Carbohydrate-Active Enzymes server)
CBB	- Coomassie Brilliant Blue
CEOS	- celooligosacharidy
CEOS-SR	- celooligosacharidy značené sulforodaminem
GH-B	- klan glykozylyhydroláz
GH7	- glykozylyhydrolázová rodina 7
GH16	- glykozylyhydrolázová rodina 16
GMOS	- galaktomanooligosacharidy
GMOS-SR	- galaktomanooligosacharidy značené sulforodaminem
GMOS2-SR	- galaktomanodisacharid značený sulforodaminem
GPC	- gelová permeační chromatografie
HEC	- hydroxyethylcelulóza
HPLC	- vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HvXET5, HvXET6	- izoenzymy XET izolované z ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>)
IEF	- izoelektrická fokusace
IEF-PAGE	- izoelektrická fokusace probíhající v polyakrylamidovém gelu
LAOS	- laminariooligosacharidy
LAOS-SR	- laminariooligosacharidy značené sulforodaminem
MALDI	- laserová desorpční ionizace na nosiči (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
MANOS	- manooligosacharidy
MANOS-SR	- manooligosacharidy značené sulforodaminem
MLGOS	- β -1,3/1,4-D glukooligosacharidy
MLGOS-SR	- β -1,3/1,4-D glukooligosacharidy značené sulforodaminem
MS	- hmotnostní spektrometrie
m/z	- hmotnost/náboj
OUA	- oligouronové kyseliny
OUA-SR	- oligouronové kyseliny značené sulforodaminem
PAGE	- polyakrylamidový gel
pI	- izoelektrický bod
PUOS	- pustulooligosacharidy
PUOS-SR	- pustulooligosacharidy značené sulforodaminem
SDS	- dodecyl síran sodný
SDS-PAGE	- elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
SR	- sulforodamin
TCA	- trichloroctová kyselina

TEMED	- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin
TLC	- tenkovrstvá chromatografie (Thin Layer Chromatography)
XEG	- xyloglukan endoglukanáza
XEH	- xyloglukan endohydroláza
XET	- xyloglukan endotransglykozyláza
XG	- xyloglukan
XGOS	- xyloglukan oligosacharidy
XGOS-SR	- xyloglukan oligosacharidy značené sulforodaminem
XGOS9-SR	- xyloglukan nonasacharid značený sulforodaminem
XTH	- xyloglukan endotransglykozyláza/hydroláza
XYLOS	- xylooligosacharidy
XYLOS-SR	- xylooligosacharidy značené sulforodaminem
3D	- třídímenzionální
[³ H]	- tritium
[¹⁴ C]	- radioaktivní izotop uhlíku